Pr 3966

HALIOTIS

VOL. 32
2003

issn 0397.765 x

SOCIETE FRANÇAISE DE MALACOLOGIE

Haliotis, revue de la Société Française de Malacologie, est ouverte à des articles originaux couvrant tous les aspects de l'étude des Mollusques. Son rythme de parution est en principe annuel.

La soumission d'un manuscrit à *Haliotis* sous-entend qu'il n'est pas publié ou sous presse ailleurs. Les auteurs qui désireront utiliser ultérieurement des matériaux publiés dans *Haliotis* devront préalablement obtenir la permission de la S.F.M.

Soumission des manuscrits

Les textes doivent être saisis sous un traitement de texte d'usage courant. Il sera soumis dans un premier temps deux exemplaires tirés sur format A4 avec double interligne, ainsi que deux copies des illustrations. Les manuscrits sont à adresser au secrétariat général de la S.F.M., 55 rue Buffon, 75005 Paris, ou à un des membres du comité de rédaction.

Le manuscrit sera lu par un ou plusieurs spécialistes choisi(s) par le comité de rédaction, dont les commentaires seront adressés à l'auteur (sous forme anonyme ou non au choix du rapporteur). L'auteur a l'obligation de prendre en considération les commentaires du rapporteur et adressera s'il y a lieu une version révisée. Le comité de rédaction prendra alors, au vu des commentaires du rapporteur, une décision d'acceptation ou de refus du manuscrit.

Organisation du texte

- titre concis et informatif: pensez qu'il doit servir à l'indexation. Si le titre contient un nom de genre ou d'espèce peu connu, ce nom sera accompagné du nom d'un taxon supraspécifique
- prénoms (en entier) et noms des auteurs
- adresses des auteurs.
- "abstract" en Anglais, précédé du titre en Anglais.
- résumé en Français (éventuellement, titre en Français si l'article est rédigé dans une autre langue) exposant les principaux résultats, mais pas de descriptions de taxa nouveaux éventuellement introduits dans l'article.; éventuellement, résumé dans une autre langue si approprié.
- texte proprement dit comprenant, dans cet ordre, Introduction, Matériel et méthodes, Résultats, Discussion, Conclusions, Remerciements, Bibliographie.

Les niveaux hiérarchiques de sous-titres seront limités le plus possible. Les sous-titres ne seront en aucun cas numérotés.

Illustrations

Seules les illustrations en noir et blanc seront prises en charge par la revue. Le surcoût des illustrations en couleur sera à la charge des auteurs. Les illustrations, à leur taille définitive, mesurent au maximum 16,5 x 23 cm.

Les illustrations soumises après acceptation des manuscrits doivent être de bonne qualité, prêtes à clicher, ou des fichers électroniques au format TIFF, 600 ppp (noir et blanc) ou 300 ppp (demi-teintes). Pour les graphiques, des tirages d'imprimante laser ou à jet d'encre sur papier sont acceptables comme originaux, mais il est préférable d'adresser une copie électronique, au format TIFF ou dans le format natif du logiciel qui a produit le graphique si celui-ci est d'usage courant (Excel, Corel Draw...) *En aucun cas, les illustrations préalablement insérées dans un traitement de texte (Word ou autre) ne pourront être reproduites par l'imprimeur (ces logiciels altèrent les fichiers d'images insérées).*

Toutes les figures doivent être numérotées en une série unique, qu'il s'agisse de dessins, de photographies montées en planche, de cartes ou de graphiques. Les cartes devront faire figurer des coordonnées géographiques et avoir un cadre. Les tableaux (comportant exclusivement du texte ou des chiffres, à l'exclusion de graphiques) seront numérotés en une autre série. Les légendes des figures et des tableaux seront regroupées sur une feuille à part, et copiées également dans la disquette. Les auteurs pourront indiquer dans le texte la position souhaitée des figures et tableaux.

(suite sur la 3e page de couverture)

5 Nuse

Contribution à l'étude des cellules neurosécrétrices de la moule africaine *Perna perna*: Etudes histologique et immunocytochimique

Soumya BENOMAR [1], Kristell KELLNER [2], Ali OUICHOU [1], Michel MATHIEU [2] et Abdellatif MOUKRIM [1]*

ABSTRACT

Comparative study of neurosecretion cells of african mussel *Perna perna* (Linné, 1758): anatomical, histological and immunocytochemical studies

The central nervous system of the mussel is involved in many regulation process of growth and reproduction cycle. Whereas some research has been performed on the nervous system of the European Mussel *Mytilus edulis*, few investigations were carried on the African Mussel, *Perna perna*. The aim of our work is to contribute to the study of the central nervous system of this Mollusc, which is widely distributed along African costs and plays an important socio-economic role. The anatomical study shows that the central nervous system of *P. perna* consists of three pairs of ganglia: Cerebral, visceral and pedal. Histological study, using Thionine paraldehyde and Romeis Azan colorations, reveals that these ganglia present the same structural organization with three areas: perineurium, cortex and neuropile. Use of signaletic stains for neurosecretion allowed the identification with light microscope of four different types of neurosecretory cells (a1, a2, a3 et a4). These cells are characterised by their neurosecretion products which take a red coloration with Azan and green-blue with Thionine. They are located in the cortex area. Compared to others, the a1 type is more abundant. The immunocytochemical study using anti-GnRH, anti-Insulin, anti-Glucagon and anti-FMRFamide, reveals that the immunoreactive sites in the cerebral and pedal ganglia are located principally in the anterior and posterior area and in the lateral region of the two ganglia. The a1 and a2 are the cells most concerned by immunoreactivity.

[1] Laboratoire Eau et Environnement, Département de Biologie, Faculté des Sciences Université Ibn Zohr, BP. 28/S, Agadir, Maroc. (* Auteur revevant la correspondance, e-mail: <moukrim@nomade.fr>)

[2] Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, Université de Caen, Esplanade de la Paix, F 14032 Caen cedex, France.

BIBL. DU MUSÉUM PARIS

Bibliothèque Centrale Muséum

3 3001 00176783 8

RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail est de contribuer à l'étude de la neurosécrétion dans les ganglions nerveux de *Perna perna* (localisation, caractérisation et cartographie immunocytochimique des cellules impliquées dans la neurosécrétion). L'étude immunocytochimique est précédée par une description des caractéristiques anatomiques et cytologiques du système nerveux central du mollusque. Les prélèvements ont été effectués entre décembre 1998 et février 2000, au Cap Ghir, site sis à 50 Km d'Agadir (sud du Maroc). Ce site est situé à proximité de l'emplacement du projet pilote de mytiliculture, installé dernièrement dans la région d'Agadir. L'examen histologique par les colorations signalétiques (Thionine paraldéhyde et l'Azan de Romeïs), montre un cortex ganglionnaire renfermant principalement des cellules neurosécrétrices (CNS). En tenant compte de leur taille, de leur forme, de l'aspect du cytoplasme, de la taille et la position du noyau, les CNS peuvent être classées en quatre types: a1 (environ 80% de la population totale), a2, a3 et a4. La technique d'immunoperoxydase indirecte, dirigée contre l'hormone libérante des gonadotropines (GnRH), l'Insuline, le Glucagon ou le tétrapeptide FMRFamide, met en évidence des sites immunoréactifs vis-à-vis de ces différents anticorps et caractérise les produits de sécrétion de nature peptidergique. L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce travail a permis d'établir, chez *Perna perna*, une cartographie des quatre types de cellules neurosécrétrices et des cellules immunoréactives vis-à-vis des quatre anti-corps utilisés.

INTRODUCTION

Au Maroc, l'espèce *Perna perna* exploitée par les populations locales le long des côtes atlantiques et méditerranéennes fait l'objet actuellement d'un projet pilote de mytiliculture installé dans la région d'Agadir. Elle est également utilisée comme espèce sentinelle pour évaluer la qualité de l'environnement au même titre que *Mytilus galloprovincialis* et *M. edulis* en Europe (Najimi *et al.*, 1997, Kaaya *et al.*, 1999; Moukrim *et al.*, 2000). Toutefois, et malgré sa large distribution le long des côtes atlantiques africaines et sud-américaines, *Perna perna*, est très peu étudiée par rapport aux autres Mytilidae. En effet, les seules recherches réalisées chez ce bivalve sont relativement anciennes et se limitent à une description morphologique et histologique générale (Umiji, 1964; 1969), aux aspects cytochimiques du système nerveux (Leonel *et al.*, 1981), ou à certains aspects de sa biologie (Lunetta, 1969). Dans ce contexte, un programme de recherches multidisciplinaires a été établi en 1992 par notre laboratoire. Les premières études ont porté sur la croissance, la reproduction et la gestion des réserves et leur relation avec les variations des différents paramètres environnementaux (Id Halla 1997; Id Halla *et al.*, 1997; Bouhaimi *et al.*, 2000). Dans le présent article, nous nous intéressons à la régulation de ces différents métabolismes.

En effet, chez les *Mytilidae*, la mise en évidence d'une variation saisonnière du métabolisme, leur grande flexibilité en réponse aux fluctuations des facteurs de l'environnement, suggèrent l'existence de mécanismes régulateurs. Ces régulations permettent l'ajustement constant du métabolisme et des différentes fonctions. Il est vraisemblable que des facteurs neuroendocriniens jouent un rôle fondamental dans ces processus, comme cela a été décrit pour *Mytilus edulis*. Chez cette espèce, l'existence d'organes endocriniens correspondant aux trois paires de ganglions: cérébroïdes, pédieux, et viscéraux, et l'existence dans ces ganglions, de cellules neurosécrétrices (Gabe, 1955; Lubet, 1955, 1959; Gubicza et Nagy, 1965; Illanes, 1979; Illanes et Lubet, 1980) ont été clairement démontrées. Ces cellules neurosécretricés sont essentiellement de type a1 et fortement colorables par la thionine paraldéhyde, avec une corrélation significative entre les étapes du cycle de reproduction et l'activité de ce type de cellules (Illanes et Lubet, 1980).

En raison des difficultés techniques rencontrées chez les bivalves marins (Lubet, 1959; 1966) pour la réalisation des études endocriniennes, une approche globale de l'action neuroendocrinienne des ganglions a été envisagée en réalisant des cultures organotypiques (Lubet *et al.*, 1987; Mathieu, 1979). De plus, la mise au point de dissociations cellulaires et les recherches d'effets biologiques d'extraits ganglionnaires sur ces suspensions de cellules cibles a permis de préciser certains mécanismes régulateurs. Ainsi, deux facteurs neuroendocriniens activateurs de la dégradation ou de la synthèse du glycogène intracellulaire, produits par les ganglions cérébroïdes et viscéraux ont été mis en évidence (Lenoir et Mathieu, 1986; Lenoir, 1989; Lenoir *et al.*, 1989). L'application de bio-essais sur ce matériel a permis de tester l'action de substances extraites des ganglions nerveux, montrant une forte activité de l'ATCase dans les tissus ayant une forte activité mitotique avec la mise en évidence d'un facteur activateur des mitoses goniales à partir des ganglions cérébroïdes (Mathieu, 1985; 1987a, 1987b; Mathieu *et al.*, 1988; Robbins *et al.*, 1990). Ces mêmes tests ont également permis de montrer l'existence d'une protéine apparentée à l'hormone de croissance (Toullec *et al.*, 1992; Toullec *et al.*, 1989). Toutes ces investigations ont permis d'aborder le problème des régulations de la croissance, des gamétogenèses et de l'utilisation de substances de réserve (glycogène) soutenant l'effort de reproduction. Toutefois, et en raison de leurs caractéristiques (petite taille et faible concentration), les facteurs homologues impliqués dans ces régulations n'ont pas été, jusqu'à présent, purifiés.

Une approche alternative a donc consisté à rechercher l'existence et l'effet biologique de molécules issues d'autres espèces et connues pour leur action régulatrice du métabolisme. Ainsi, plusieurs molécules ont été testées chez les mollusques. Les peptides GnRH-like semblent jouer un rôle dans le processus de reproduction (Pazos et Mathieu, 1999), les molécules apparentées à l'insuline semblent être impliquées dans la régulation de la croissance chez les mollusques (Smit *et al.*, 1988; Kits *et al.*, 1990; Gomot *et al.*, 1992); alors que le FMRFamide intervient, comme facteur cardio-excitateur chez les mollusques.

Le travail présenté dans cet article se propose de localiser et de caractériser les différentes cellules impliquées dans la neurosécrétion dans les ganglions nerveux de *Perna perna* et d'établir une cartographie immunocytochimique du systèmes nerveux de ce mollusque, en se référant à la cartographie des marquages obtenus chez *Mytilus edulis*.

Cette étude immunocytochimique est précédée par une description des caractéristiques anatomiques, cytologiques du système nerveux central de *Perna perna*. L'ensemble des résultats obtenus dans la cadre de ce travail est exposé d'une manière comparative par rapport aux données disponibles chez *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des prélèvements mensuels ont été effectués entre décembre 1998 et février 2000, au Cap Ghir, site situé à 50 km au nord d'Agadir, loin de toute activité anthropique. Ce site est situé à proximité de l'emplacement du projet pilote de mytiliculture, installé récemment dans la région d'Agadir.

Pour l'étude topographique du système nerveux central, des petites moules juvéniles de 1 à 2 cm sont fixées dans du Bouin pendant 15 à 20 jours jusqu'à ce que la coquille s'amenuise et se détache du tissu mou. La partie molle entière est déshydratée, incluse dans la paraffine, puis débitée en coupes sériées de 7 µm. Ces dernières sont colorées par l'Hématoxyline d'Erlich-Eosine.

En vue de l'étude histologique relative à la neurosécrétion, des adultes prélevés sont fixés directement dans le Bouin pendant 24 h. Après dissection, les ganglions cérébroïdes et pédieux sont remis dans le fixateur durant 24 à 48 h, déshydratés et inclus dans la paraffine. Ils sont ensuite débités en coupes de 5 à 7 µm. Deux colorations signalétiques sont effectuées, la thionine paraldéhyde (Illanes, 1979; Illanes et Lubet, 1980) et l'Azan de Roméis (Gabe, 1955), afin de mettre en évidence les cellules neurosécrétrices, très chromophiles vis à vis de ces colorants.

Pour l'immunoperoxydase indirecte, les échantillons sont fixés, déshydratés et inclus de la même façon que pour ceux destinés à l'étude de la neurosécrétion. Les coupes des ganglions sont déparaffinées, puis incubées pendant 30 minutes dans du méthanol contenant de l'eau oxygénée à 30%, afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Les tissus réhydratés et rincés dans deux bains de 10 min dans du tampon I (Tris: 6.06 g/l; NaCl: 8.78 g/l; Gélatine: 2.5 g/l; Triton X-100: 5 ml/l; pH = 7.4). Ces coupes sont incubées en présence de l'anticorps primaire dilué dans le tampon I (350 µl). Les anticorps, fournis par Peninsula Laboratories inc., sont utilisés aux dilutions suivantes: GnRH (IHC 7201, Rabbit Anti-LH-RH Serum) à 1/400ème, 1/250ème et 1/150ème; l'Anti-Insulin (GHC 7303, Guinea anti-Insulin, Human-Serum) à 1/100ème; l'anti-Glucagon (IHC 7165, Rabbit anti-Glucagon) à 1/350ème et l'Anti-FMRFamide (IHC 8755, Rabbit Anti-FMRFamide Serum) à 1/1000èmes. L'incubation se déroule en atmosphère humide à 4°C. Elle dure 24 h et est suivie par deux lavages dans le tampon I. Immédiatement, les coupes sont incubées par l'anticorps secondaire (350 µl) pendant 1 h à température ambiante et en chambre humide, en utilisant des immunoglobulines de porc anti-Ig de lapin couplées à la peroxydase (Dako, dilution 1/100ème dans le tampon II). Il s'en suit deux lavages successifs de 10 min dans le Tampon II (Tris: 6.06 g/l; NaCl: 8.78 g/l; pH = 7.4). Puis les coupes sont incubées avec 300 µl de DAB (Diamino-benzidine: 0.5mg/ml de Tampon II) durant 10 à 20 min à température ambiante, permettant la révélation peroxydasique par la formation d'un précipité brun. Trois lavages de 5 minutes dans le tampon II suivent cette révélation. Les coupes de ganglions sont déshydratées, colorées au vert lumière, puis montées au Depex (Gurr).

RÉSULTATS

Anatomie du système nerveux

Comme chez les autres Mytilidés, la moule africaine *Perna perna* présente un système nerveux central comptant trois paires de ganglions de couleur blanc laiteux: cérébroïdes, pédieux et viscéraux. Ces trois paires, de disposition symétrique, sont reliées entre elles par des commissures et des connectifs (Figure 1). Les ganglions présentent les mêmes structures, dimensions et position que celles des autres Mytilidés, décrits par Lubet (1955), Umiji (1964; 1969) et Illanes (1979). Il en est de même pour la position des différents nerfs partant des ganglions et qui sont responsables de l'innervation des différents organes (manteau, muscle, byssus, pied, etc.). Toutefois, il est à signaler que dans le cas de *Perna perna*, deux nerfs rétracteurs du byssus partent de chaque ganglion pédieux, contrairement aux autres mytilidés qui ne présentent qu'un seul nerf.

Etude histologique des ganglions

L'examen histologique des ganglions de *Perna perna* montre une organisation générale similaire à celle décrite chez d'autres Mytilidés. Ces centres nerveux étant constitués, de l'extérieur vers l'intérieur, du périneurium, cortex ganglionnaire et neuropile (Figure 2, a).

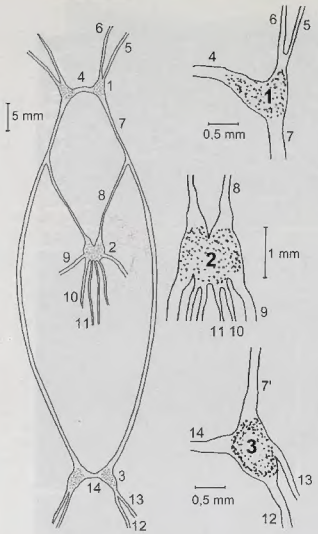


Figure 1. Système nerveux central de *Perna perna.*
1- ganglion cérébroïde, 2- ganglion pédieux, 3- ganglion viscéral, 4- commissure inter-cérébrale, 5- nerf labial, 6- nerf palléal antérieur, 7-7'- connectif cérébro-pédo-viscéral ou connectif commun, 8- connectif cérébro-pédieux, 9- nerf pédieux, 10- nerf du muscle rétracteur médian du byssus, 11- nerf du muscle rétracteur postérieur du byssus, 12- nerf palléal postérieur, 13- nerf branchial et 14- commissure inter-viscérale.

Le périneurium constitue l'enveloppe des ganglions. Il présente une affinité tinctoriale différente pour les deux colorations utilisées: bleue avec l'Azan de Romeïs et rose à rouge pour la Thionine paraldéhyde.

Le neuropile, de structure fibrillaire, occupe une surface variable de 50 à 70% de la surface totale des ganglions. Bien homogène, il est de couleur beige rosée en utilisant la Thionine paraldéhyde et rose violacée avec l'Azan de Romeïs (Figure 2, a et d). Des travées de quelques cellules nerveuses (3 à 5), présentes dans les ganglions et dans la commissure cérébroïde, peuvent séparer les fibres nerveuses constituants le neuropile. Ce sont des cellules neurosécrétrices (CNS), pour la plupart vidées de leur produits de sécrétion, accompagnées par des cellules gliales (Figure 2, b). La limite cortex/neuropile est marquée d'une part, par la présence des cellules gliales, et d'autre part, par l'emplacement des axones, chargés de produits de neurosécrétion, orientés en position centrifuge.

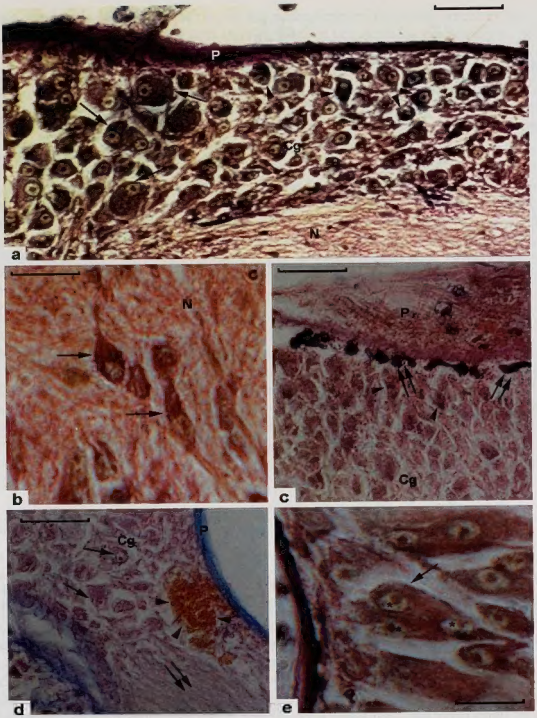


Figure 2. Coupe histologique d'un ganglion de *Perna perna*. **a**: Cortex ganglionnaire (Cg), Neuropile (N), Neurones (flèche, photos a et d), Périneurium (P), CNS (tête de flèche, Photos a et c). **b**: Cellules gliales (flèche). **c**: Granulocytes (double fleche). **d**: Amas cellulaires chromolipoïdes (tête de flèche) à la limite du nerf cérébro-pédieux (double flèche). **e**: Cellules à vacuoles (flèche) avec 3 noyaux (étoile). Coloration à la Thionine paraldéhyde (photos a,b, c et e); coloration à l'Azan de Roméis (photo d). Barres d'échelle: 10 µm (photos a, c et d); 5 µm (photos b et e).

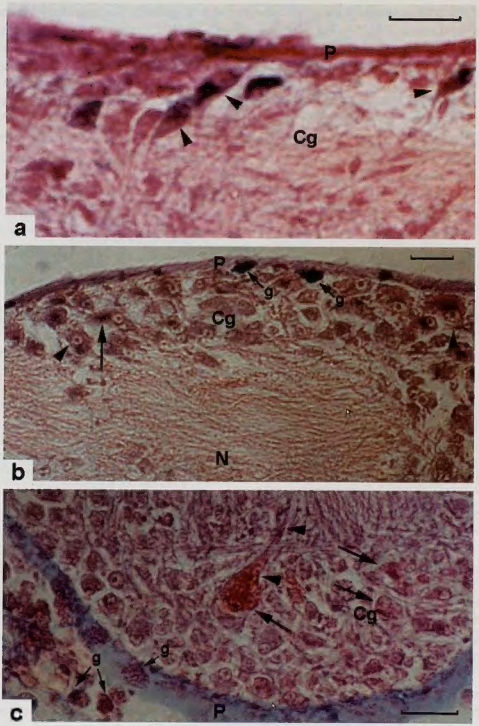


Figure 3. Cellules neurosécrétrices des ganglions nerveux de *Perna perna*. **a**: CNS de type a1 (tête de flèche). **b**: CNS de type a2 (flèche) et a3 (tête de flèche). **c**: CNS de type a4 (flèche) dont une géante avec axone (tête de flèche) et noyau (étoile). Cortex ganglionnaire (Cg), Neuropile (N), Périneurium (P) et Granulocytes (g). Coloration: Thionine paraldéhyde (photos a et b), Azan de Roméis (photo c). Barres d'échelle: 5 µm

Le cortex ganglionnaire renferme plusieurs types de cellules: 1 - neurones (Figure 2, a), 2 - cellules gliales (Figure 2, b), 3 - granulocytes (Figure 2, c), 4 - amas cellulaires chromolipoïdes (Figure 2, d), 5 - cellules neurosécrétrices et 6 - cellules à vacuoles (Figure 2, e). Ces cinq premiers types de cellules sont décrits dans le tableau 1.

Tableau 1. Description des différents types de cellules nerveuses du cortex ganglionnaires.

Type cellulaire	Caractéristiques			
	Forme	**Taille**	**Noyau**	**Observations**
Neurones	Piriformes, uni ou bi-polaires ± allongées	8-17 µm (type I) 45 µm (type II)	Centré, 4-9 µm, vert pâle, nucléole rose foncé.	Deux types différents par leur taille Nombre réduit Cytoplasme rose par la thionine et bleue par l'Azan de Roméis Cône axonal visible
Cellules gliales	Piriformes, fusiformes ou ovales	4-7 µm	2-5 µm	Deux types de cellules : Type I. formant une assise discontinue bordant le périneurium. Cytoplasme hyperchromatique. Type II. se caractérise par l'affinité tinctoriale de leurs noyaux. Peuvent avoir des prolongements très fins et longs
Granulocytes	Généralement sphériques ou ovoïdes	5-12 µm	Décentralisé, couleur vert pâle ou jaune, avec nucléole plus foncé.	Cellules renfermant des inclusions granulaires de tailles homogènes mais de répartition hétérogène
Amas cellulaires	Ovale	-	-	Nombre de 3 à 5 au maximum. Toujours à la périphérie Renfermant des petites cellules de couleur i) jaune-orange à noyau rose, entourées par des granules bleuâtres, ou ii) bleu-violet avec des noyaux assez gros.
CNS	Voir texte (paragraphe ci-dessous)			
Cellules à vacuoles	Piriformes, uni ou bi-polaires	25-40 µm	2 à 3 noyaux, le plus gros, 8 µm, est opposé à l'axone.	Péricaryon hétérogènes, renfermant des vacuoles claires ou sombres par la présence de granules bleu-verts. Vacuoles placées autour du noyau.

Les cellules neurosécrétrices (CNS) se distinguent des autres cellules nerveuses par la chromophilie du produit de neurosécrétion: elles prennent soit une teinte rouge par l'Azan de Roméïs avec des granulations jaunes orangés; soit une coloration vert-foncée à bleu-violette par la Thionine paraldéhyde, cette dernière coloration caractérisant le mieux les différents types de CNS (Figure 3). Elles présentent un péricaryon de forme sphérique, ovoïde, piriforme, fusiforme, triangulaire, cubique ou même irrégulier. Leur polarité est également variable (uni- , bi- ou multipolaire). Leur noyau, de 2 à 8 µm, est décentré, situé à l'opposé du cône axonal et renferme toujours un nucléole bien visible.

Les CNS présentent une localisation bien définie, sont symétriquement situées de part et d'autre de la commissure, qu'il s'agisse des ganglions cérébro-pleuraux ou des pédieux. Elles se concentrent principalement dans le cortex voisin des voies de liaisons interganglionnaires et semblent plus nombreuses dans les ganglions cérébroïdes.

L'accumulation des grains de neurosécrétion de ces cellules est variable. Certaines CNS sont entièrement chargées de produits de neurosécrétion, d'autres présentent un cytoplasme granuleux et des grains de neurosécrétion plus denses entourant le noyau. Nos observations ont montré également la présence de CNS colorées en vert rosé (par la thionine paraldéhyde) avec des grains de sécrétion bleuâtres libres ou incluses dans des petites vacuoles placées dans le cône axonal. Il s'agit vraisemblablement de cellules qui viennent de libérer des produits de sécrétion. Ce processus de vidange sécrétoire a été également signalé chez *Mytilus edulis* par Illanes (1979).

Les CNS de *Perna perna* varient en taille, forme, aspect du cytoplasme, granules de sécrétion, taille et position du noyau. Nous avons utilisé ces paramètres pour identifier les différentes CNS chez cette espèce, comme l'a fait Illanes pour *M. edulis*. Quatre types de CNS ont été identifiés (Figure 3):

- *Les CNS de type a1* (Figure 3, a) sont les plus nombreuses, surtout dans les ganglions cérébroïdes. Généralement de petite taille (5 à 12 µm en moyenne) et en fonction de leur stade d'évolution, peuvent être piriformes, ovoïdes ou fusiformes, unipolaires ou bipolaires. Leur noyau est légèrement décentré, opposé au cône axonal, avec toujours un seul nucléole. Il peut atteindre une taille de 3 à 6 µm et peut occuper l'ensemble du péricaryon chez les cellules de forme ovoïde. Le cytoplasme se caractérise par une forte affinité tinctoriale, cette variation pouvant s'expliquer par le stade d'évolution du cycle sécrétoire des CNS: lorsqu'elles sont pleines, le cytoplasme semble homogène; quand elles se vident, ce dernier prend un aspect granuleux plus ou moins dense. Leurs axones sont parfois visibles, surtout pour les plus grosses, montrant parfois une direction vers le périneurium. Ces cellules sont localisées aussi bien dans les parties larges que minces du cortex ganglionnaire, de façon périphérique ou centrale.
- *Les CNS de type a2* (Figure 3, b), de 20 à 30 µm, ont généralement une forme piriforme ou sphérique. Elles peuvent être unipolaires, mais aussi bipolaires ou multipolaires avec des axones nettement visibles. Leur cytoplasme est homogène, avec des grains de neurosécrétion répartis dans tout le péricaryon, généralement autour du noyau ou encore présents à l'émergence du cône axonal, pour s'acheminer par voie axonale sous forme de granules. Exceptionnellement, on remarque des grains de neurosécrétion inclus dans des vacuoles dans ce type de CNS. La localisation de ces CNS est bien définie dans le ganglion. Elles se rencontrent dans le cortex épais surtout périphérique, en nombre plus limité que les CNS *a1*. Cette distribution est symétrique dans les deux ganglions de même type.
- *Les CNS de type a3* (Figure 3, b) ont une taille comprise entre 18 et 25 µm. Elles sont soit ovoïdes soit piriformes, souvent unipolaires ou bipolaires, avec un axone bien visible. Elles renferment le plus souvent un noyau de taille variable de 4 à 9 µm. Les produits de neurosécrétion toujours bleu vert (Thionine paraldéhyde), sont localisés soit autour du noyau soit engagés dans le cône axonal pour être transportés. Cela pourrait suggérer un stade d'évolution cellulaire de fin d'activité du cycle sécrétoire. Ces CNS sont présentes dans les deux ganglions cérébroïdes et pédieux, mais en nombre réduit par rapport aux deux premiers types de CNS.
- *Les CNS de type a4* (Figure 3, c), d'une taille moyenne comprise entre 12 et 18 µm, ont une forme générale sphérique. Contrairement aux cellules du même type observées chez *Mytilus edulis* (Illanes, 1979; Illanes et Lubet, 1980), le cône axonal est visible, large et clair. Leur noyau légèrement décentré, ne dépasse pas les 6 µm. Pour les plus grosses cellules, le contour est irrégulier . Le cytoplasme se caractérise de celui des autres péricaryons par le nombre important des vacuoles réparties en périphérie, vers le départ de l'axone, ou plus généralement à proximité du noyau. Ces vacuoles, de dimension variable, sont soit vides et paraissent claires (blanchâtres), soit remplies de granules plus ou moins grossiers et se montrent sombres (grises).

L'identification des quatre types de cellules neurosécrétrices dans les ganglions, à travers l'observation de la totalité des différentes coupes sériées de ces derniers, a permis d'établir la cartographie de ces cellules, aussi bien dans les ganglions cérébroïdes que pédieux (Figure 5). Cette répartition présente un caractère répétitif chez les différents individus qui ont fait l'objet de cette étude.

Etude immunocytochimique des ganglions

Cette étude a permis aussi bien d'identifier les différents sites immunoréactifs vis à-vis des quatre anti-corps (anti-GnRH, anti-Insuline, anti Glucagon et anti FMRFamide), que d'établir une cartographie de l'immunoréactivité des cellules neurosécrétrices (Figure 5).

Localisation des sites immunoréactifs vis à vis de l'anti-GnRH:

L'exploration immunohistochimique des ganglions nerveux de *Perna perna* par l'anticorps dirigé contre l'hormone gonadolibérine met en évidence des sites immunoréactifs localisés aussi bien dans les ganglions cérébroïdes que pédieux, avec une répartition différente entre les 2 types de ganglions (Figure 4, a et Figure 5).

Dans les ganglions cérébroïdes, les neurones immunoréactifs à l'anti GnRH sont localisés dans trois zones bien définies: la région antérieure et le départ de la commissure cérébrale, la région postérieure vers le connectif cérébro-pédieux-viscéral et la région interne latérale. Ces neurones sont alignés sur une ou deux couches parallèles au périneurium.

Dans les ganglions pédieux, les cellules immunoréactives sont principalement localisées dans la région antérieure au départ du connectif cérébro pédieux, sur une à deux assises, et dans la région postérieure au niveau des nerfs pédieux et des nerfs rétracteurs postérieurs ou médians du byssus, en formant quatre à cinq couches de cellules.

Ces neurones immunoréactifs correspondent principalement à la répartition des CNS de type a1 (65%) et aux CNS de type a2 (25%). La réaction à l'anticorps est homogène, occupe tout le péricaryon, avec parfois des granules très foncés autour du noyau ou dans la région centrale du péricaryon.

Dans la région antérieure du ganglion cérébroïde, on note la présence de grosses vacuoles dites, d'après Illanes (1979), cellules à cryptes. Chaque cellule renferme 2 ou 3 noyaux, dont le plus gros, centré, mesure 7µm. Ces cellules montrent une réaction à l'anticorps. Il en est de même pour certains amas de très petites cellules situées, de manière symétrique, au départ du nerf palléal. La présence de quelques cellules immunoréactives a été également détectée dans la commissure cérébrale, le connectif cérébro-pédieux-viscéral et le nerf labial.

Localisation des sites immunoréactifs vis à vis de l'anti-Insuline:

Dans les ganglions cérébroïdes, les cellules immunoréactives à l'anti-Insuline sont présentes principalement dans la partie antérieure du ganglion, du côté du nerf palléal et dans la région latérale externe vers le connectif cérébro pédieux viscéral (Figure 4, c et Figure 5).

Dans les ganglions pédieux, deux sites principaux de marquage ont été observés: i) dans la région antérieure, en une seule assise; et ii) dans la zone postérieure vers les nerfs pédieux et les nerfs du muscle rétracteur postérieur et médian du byssus, en formant au moins deux assises cellulaires. Cette distribution se fait de façon symétrique dans les deux ganglions nerveux.

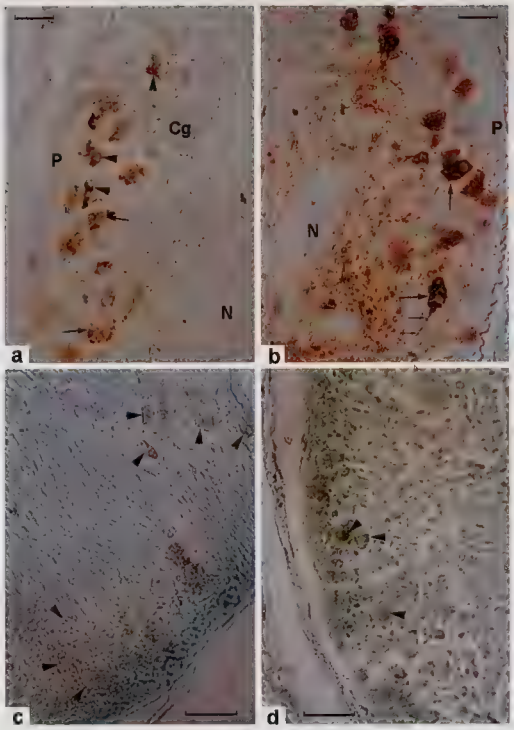


Figure 4. Localisation des sites immunoréactifs. **a**. Ganglions cérébroïdes, sites réactifs vis à vis de l'anti-GnRH ; **b** Ganglions cérébroïdes, sites réactifs vis à vis de l'anti-FMRFamide, **c**: Ganglions pédieux, sites réactifs vis-à-vis de l'anti-Insuline; **d**: Ganglions cérébroïdes, sites réactifs vis à vis de l'anti-Glucagon. CNS a1 (tête de flèche), CNS a2 (flèche) avec son axone (petite flèche). Fibres nerveuses (étoile). Barres d'échelle: 5 µm.

Les CNS immunoréactives à l'anti-Insuline sont généralement du type a1 (89%). Le matériel cytoplasmique est soit homogène, soit hétérogène avec des granules beaucoup plus marqués entourant le noyau ou engagés dans le départ axonal.

Dans le connectif intercérébroïde, dans la partie proche des ganglions, se situe un ensemble de cellules immunoréactives, formant une masse de cellules globuleuses mal délimitées, qui renferme des granulations très condensées autour du noyau. Elles paraissent de même taille, sphériques ou cubiques. Dans les ganglions cérébroïdes, cet ensemble se caractérise par une masse réactive à l'anti-Insuline, localisée dans la région latérale externe.

Localisation des sites immunoréactifs vis à vis de l'anti-Glucagon:

Les cellules immunoréactives à l'anti Glucagon se situent principalement dans la région antérieure du ganglion sur les aires latérales du connectif cérébro-pédieux et dans la région postérieure de part et d'autre des nerfs du muscle rétracteur médian et postérieur du byssus (Figure 5). Elles sont faiblement réactives par rapport aux précédentes (Figure 4, d). Comme dans le cas de l'anti-GnRH, les cellules immunoréactives à l'anti Glucagon sont en majorité de type a1

Localisation des sites immunoréactifs vis à vis de l'anti FMRFamide:

Dans les ganglions cérébroïdes, les cellules immunoréactives à cet anticorps sont situées d'une part, dans l'aire antérieure du côté du nerf palléal; et d'autre part, dans l'aire postérieure et les régions latérales interne ou externe. Elles sont présentes également dans le départ de la commissure cérébrale, et à l'entrée du connectif cérébro pédieux (Figure 5). Toutefois, dans les ganglions pédieux, les cellules immunoréactives sont localisées uniquement dans la région antérieure de part et d'autre de la commissure pédiale et du connectif cérébro-pédieux en formant des amas. Il est à noter que ces cellules, dans les deux ganglions sont, pour la plupart, situées dans le cortex ganglionnaire interne.

Les cellules immunoréactives à l'anti FMRFamide sont essentiellement de types a1 et a2. Leur distribution rappelle celle de l'anti-GnRH. Par rapport aux autres anticorps, le péricaryon des cellules a1 marquées à l'anti FMRFamide se caractérise par une intensité très marquée. En effet, leur cytoplasme est soit homogène noirâtre, soit hétérogène et granuleux, avec des granules grossiers foncés, périnucléaires ou répartis dans l'ensemble du péricaryon (Figure 4, b).

Les cellules immunoréactives du type a2 montrent un cytoplasme hétérogène avec des plages très sombres à proximité du noyau, et des plages plus claires dans la partie inférieure du péricaryon, près du départ axonal.

Outre ces deux types cellulaires immunoréactifs, il faut signaler la présence de cellules à cryptes, caractérisées par des vacuoles claires (dont les plus grosses peuvent atteindre 6 µm). Ces cellules à cryptes se localisent spécifiquement dans la région antérieure du ganglion cérébroïde, vers le départ du nerf palléal.

Un groupe de cellules immunoréactives a été remarqué dans les parties médianes des régions antérieures ou postérieures du ganglion cérébroïde de façon symétrique Elles sont globuleuses, isolées au nombre de 3 à 5, plus sombres, à noyau clair décentré ou centré, et mesurant en moyenne 22.5 x 15 µm Elles semblent renfermer des sortes de grosses concrétions pleines de granules très sombres à leur périphérie (Figure 4, b).

Il faut noter aussi que le neuropile des ganglions nerveux de *Perna perna*, spécialement celui des pédieux, montre une réaction très positive vis à vis de l'anti FMRFamide d'une part, au niveau des fibres nerveuses; et d'autre part, au niveau de petites cellules semblables aux cellules gliales.

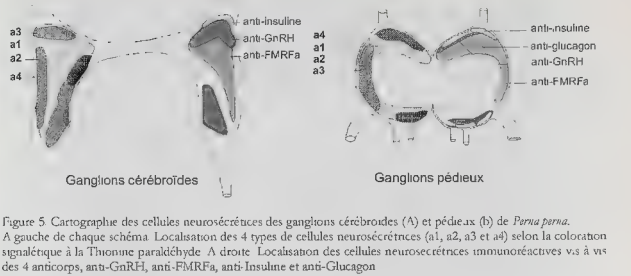


Figure 5. Cartographie des cellules neurosécrétrices des ganglions cérébroïdes (A) et pédieux (b) de *Perna perna*.
A gauche de chaque schéma. Localisation des 4 types de cellules neurosécrétrices (a1, a2, a3 et a4) selon la coloration signalétique à la Thionine paraldéhyde. A droite. Localisation des cellules neurosecrétrices immunoréactives vis à vis des 4 anticorps, anti-GnRH, anti-FMRFa, anti-Insuline et anti-Glucagon

DISCUSSION

L'étude morphologique et anatomique montre que, d'une manière générale, la moule africaine *Perna perna* présente un système nerveux comparable à celui des autres Mytilidés, *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*, décrit dans la littérature (Lubet, 1955; Gubicza et Nagy, 1965; Tsuneki, 1974; Illanes, 1979; Illanes et Lubet, 1980; Lubet et Alaoui, 1986). Toutefois, deux différences sont observées chez ce mollusque: i) l'existence de deux nerfs rétracteurs du byssus partant de chaque ganglion pédieux, contrairement à un seul chez les deux Mytilidés ci dessus cités, et ii) la présence de deux sinus hémolymphatiques symétriques à proximité de la commissure cérébroïde.

Les résultats relatifs à l'étude histologique révèlent que le cortex ganglionnaire, chez *Perna perna*, présente les mêmes types de structures neuronales décrits chez *Mytilus edulis* par Illanes (1979). Ces résultats montrent aussi l'existence de 4 types de cellules neurosécrétrices (CNS) présentant une forte affinité tinctoriale vis à vis de la thionine paraldéhyde, ce qui leur confère le caractère dominant de basophilie vis à vis de ce colorant signalétique, observé également chez *Mytilus edulis* (Illanes et Lubet, 1980). L'utilisation de l'azan de Roméis comme colorant a mis en évidence quelques CNS acidophiles colorées intensément par l'azocarmin, signalées chez *Crépidula fornicata* (Catania, 1973) ou chez *Mytilus edulis* (Illanes, 1979). Bien que ces CNS aient été révélées chez d'autres espèces de lamellibranches (Gabe et Rancurel, 1958; Nagabushanam, 1963, Antheunisse, 1963; Umuji, 1964; Tsuneki, 1974; Illanes et Lubet, 1980; Lubet et Alaoui, 1987), le nombre de types cellulaires diffère d'un auteur à un autre. Ainsi, Tuneski (1974) et Illanes et Lubet (1980), chez *Mytilus edulis*, ont décrit 3 types de CNS. Umuji chez *Mytilus perna* n'a pu en déceler que deux. Selon Catania (1971; 1973) et Catania *et al.* (1986), la Crépidule présente 2 types de CNS; alors que Bellhsen (2000) n'a observé qu'un seul type chez l'Ormeau.. Cette différence pourrait s'expliquer soit par les critères utilisés pour différencier les types des CNS, soit par la spécificité de chaque espèce. Par ailleurs, les CNS, chez *Perna perna*, paraissent plus petites que celles décrites chez *Mytilus edulis*, et leur site de localisation paraît plus large (Figure 5). Comme chez les autres Mytilidés, le type a1 montre la plus forte proportion dans les ganglions nerveux de

Perna perna. L'implication de ces cellules dans les processus physiologiques a été rapportée par plusieurs auteurs. Illanes et Lubet (1980) notent que le nombre de ces cellules fluctue en fonction du cycle annuel et qu'elles enregistrent des cycles sécrétoires étroitement liés à l'évolution de la gamétogénèse (Illanes et Lubet, 1980, Lubet et Alaoui, 1987; Lubet *et al.*, 1987; Lubet et Mathieu, 1990; Mathieu *et al.*, 1991). Ces CNS agissent probablement sur le contrôle endocrinien de la reproduction via leurs produits de sécrétion (Lubet et Streiff, 1982; Mathieu *et al.*, 1991). Bien que ces produits de neurosécrétion n'aient pas pu être purifiés, des bio-essais avec des extraits ganglionnaires ont révélé la présence d'un facteur favorisant les mitoses goniales et la méiose chez le mâle (Mathieu et Lubet, 1982; Mathieu, 1985, 1987a, 1987b), et d'un autre facteur soutenant la vitellogenèse (Lubet et Mathieu, 1978; Mathieu, 1987b).

L'étude histologique au voisinage de la commissure cérébrale, a permis de révéler la présence de deux sinus hémolymphatiques avec des hémocytes de même affinité tinctoriale que les produits de sécrétion des axones contenus dans la commissure cérébrale (Figure 6, a et b). Ceci nous a conduit à supposer que la région neurohémale est bien localisée à proximité de la commissure cérébrale chez *Perna perna*. L'étude immunocytochimique dans cette région, vis à vis des anticorps étudiés, notamment l'anti-FMRFamide, a confirmé ce constat, essentiellement par le marquage des fibres nerveuses entourant les espaces hémolymphatiques (Figure 6, c). A notre connaissance, aucun autre auteur n'a décrit cette zone chez les autres espèces de Mytilidés. Toutefois, Tsuneki (1974) en se basant sur l'observation des cellules fuschinophiles, a supposé sa présence dans la commissure cérébrale de *Mytilus edulis*. La même proposition a été avancée par Catania *et al.* (1986) chez la Crépidule, suite à l'observation de corps en grappes fortement azanophiles libérés dans les espaces hémolymphatiques. Des études ultrastructurales dans le systèmes nerveux de *Perna perna*, s'imposent pour vérifier cette hypothèse.

Les études immunocytochimiques, utilisant des anticorps permettant la localisation de molécules issues d'autres espèces et connues par leur action régulatrice du métabolisme, montrent pour la première fois chez la moule africaine, *Perna perna*, une réaction positive vis à vis de l'anti-GnRH, anti-Insuline, anti Glucagon et anti-FMRFamide. Les CNS de type a1 montrent, d'une manière dominante, une immunoréactivité positive pour les trois premiers anticorps; alors que pour l'anti-FMRFamide, ce sont les CNS a2 qui sont majoritaires. Mathieu et Van Minnen (1989) ont identifié d'autres CNS dans les ganglions cérébroïdes de *Mytilus edulis*, différentes par leur immunoréactivité vis à vis de l'anti-somatostatine, anti MSH, anti-CCK, et anti FMRFamide.

Les CNS immunoréactives à l'anti-GnRH, des ganglions cérébroïdes et pédieux de *Perna perna*, montrent une localisation similaire à celle retrouvée récemment chez *Mytilus edulis* (Pazos et Mathieu, 1999). Ces résultats suggèrent l'existence possible des molécules GnRH-like contenues dans les CNS de *Perna perna* ressemblant à d'autres membres de la famille GnRH. La distribution et la morphologie des cellules marquées, correspondant au type a1 comme décrit chez *Mytilus edulis* (Pazos et Mathieu, 1999) indique une spécificité de la réaction immunologique. Chez les mollusques bivalves la GnRH exerce, in vitro, un effet mitogène sur les cellules goniales (Pazos et Mathieu, 1999). De plus, en raison de la présence d'une immunoréactivité vis à vis de l'anti-GnRH, aussi bien chez *Mytilus edulis* que chez *Perna perna*, dans les ganglions cérébroïdes, et de l'implication de ces derniers dans le contrôle de la reproduction (Lubet et Mathieu, 1990; Mathieu *et al.*, 1991), il est possible que les peptides GnRH-like soient présents dans le système nerveux central des bivalves et qu'ils participent dans le processus de régulation de la reproduction.

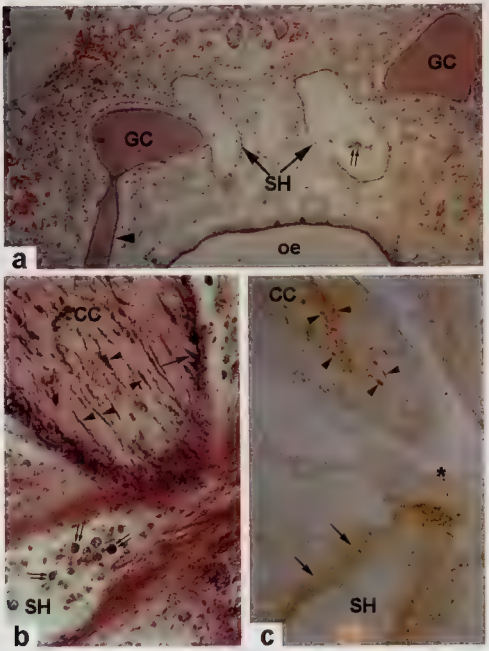


Figure 6. Zone de contact entre la commissure cérébrale et le sinus hémolymphatique.
a: Présence de 2 sinus hémolymphatiques (SH) à proximité des ganglions cérébroïdes (GC) (coloration à l'Azan). **b** et **c**: Aire neurohémale (étoile) (photo b: coloration à la Thionine paraldéhyde: des hémocytes (double flèche) de même affinité tinctoriale que les produits de neurosécrétion dans les axones (tête de flèche) et les CNS (flèche); photo c. immunoréactivité vis à vis de l'anti-FMRFamide avec fibres nerveuses immunoréactives (flèche) autour du sinus hémolymphatique). Barres d'échelle: 200 µm (photo a); 5 µm (photos b et c).

Dans les ganglions cérébroides de *Perna perna*, l'immunoréactivité vis à vis de l'anti Insuline concernant principalement les CNS de type a1, se localise dans les mêmes régions citées chez *Mytilus edulis* (Kellner-Cousin *et al.*, 1994). Différents éléments semblent prouver l'implication des molécules de cette famille dans la régulation de la croissance des mollusques (Smit *et al.*, 1988; Kits *et al.*, 1990; Gomot *et al.*, 1992), ou dans l'évaluation des effets neurotoxiques des métaux lourds chez les escargots utilisés comme bioindicateurs (Gomot *et al.*, 1997). Des effets biologiques de l'insuline de vertébrés ont été démontrés chez différents mollusques (Kellner Cousin *et al.*, 1994; Giard *et al.*, 1998; Lebel *et al.*, 1996). L'immuno-réactivité neurosécrétoire de ce peptide, dans les ganglions cérébroides de *Mytilus galloprovinaalis*, est intimement liée au cycle des réserves et inversement corrélée au cycle sexuel (Danton *et al.*, 1996; Mathieu, 1994). D'où l'implication de molécules de type insuline dans le contrôle du métabolisme des réserves chez la moule, avec un éventuel rétrocontrôle de la gonade sur le système nerveux gonadotrope (Danton *et al.*, 1996).

L'immunoréactivité des CNS vis à vis de l'anti Glucagon a été surtout observée, chez *Perna perna*, dans les ganglions pédieux. Selon Kellner *et al.* (2002), cette molécule paraît être impliquée, chez les Mytilidés, dans la régulation du métabolisme énergétique associé à la reproduction.

L'immunocytochimie utilisant l'anti-FMRFamide a montré une forte réaction concernant principalement les CNS de type a2. Cet anticorps a marqué les mêmes CNS chez *Mytilus edulis* (Mathieu et Van Minnen, 1989). Ce peptide intervient comme facteur cardio-excitateur et contribue à la modulation de la transmission neuromusculaire chez les mollusques (Brussaard *et al.*, 1988; Mounzih et Gritfond, 1992). Il semble être impliqué dans le contrôle nerveux des activités sécrétrices des cellules épithéliales, par sa présence dans les cellules digestives ou par l'immunoréactivité positive au niveau des voies gonadiques chez *Pecten maximus* (Henry *et al.*, 1995).

L'immunocytochimie vis à vis de ces 4 peptides, GnRH like, Insuline like, Glucagon, et FMRFamide a confirmé la nature peptidergique des CNS des ganglions nerveux de *Perna perna*, avec une dominance nette des neurones de type a1, et en deuxième lieu a2. Les CNS réactives à l'anti FMRFamide ont des axones bien visibles se prolongeant dans des fibres marquées qui peuvent être suivies dans le neuropile et dans la commissure et des nerfs à proximité des aires neurohémales adjacentes à la commissure cérébrale Ceci est en faveur du rôle que jouerait la jonction commissure cérébrale-sinus hémolymphatique comme aire neurohémale où se déversent les produits de neurosécrétion, probablement des neurohormones, chez la moule africaine *Perna perna*.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail contribue dans la connaissance des processus de la régulation (reproduction, croissance, métabolisme énergétique et excitabilité et neurotransmission) chez la moule africaine *Perna perna*. Toutefois, ces recherches doivent être complétées par une étude d'identification des produits de la neurosécrétion.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Monsieur le Professeur Pierre Lubet (Université de Caen) pour ses conseils et sa lecture critique de ce manuscrit, et Madame Joelle Barbier pour son assistance technique Ils

remercient également le REMER, le Ministère de l'Enseignement Supérieur, la Formation des Cadres et de la Recherche Scientifique (Maroc), le Ministère des Affaires Etrangères (France) et l'IFS (Suède) pour leur soutien financier.

BIBLIOGRAPHIE

Antheunisse L , 1963 Neurosecretory phenomena in the Zebra mussel *Dreissensia polymorpha* Pall *Archives Néerlandaises de Zoologie* **3**: 237-314.

Belhsen O K , 2000 Etude cytologique de la gamétogenèse, du système nerveux central et du cycle de reproduction de l'Ormeau européen *Haliotis tuberculata* (L) *Thèse de Doctorat*, Université de Caen, 246p.

Bouhaimi A , Id Halla M , Kaaya A., Mathieu M & Moukrim A , 2000. Etude comparative de deux populations naturelles de moules *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis* dans la baie d'Agadir (sud du Maroc): suivi de la croissance et de la dynamique de population. *Haliotis* **29**: 27-41.

Brussaard A , Kits B, TerMaat K.S., Van Minnen J & Moed P J , 1988. Dual inhibitory action of FMRFamide on neurosecretory cells controlling egg laying behavior in the pond snail *Brain Research* **447**: 35-51.

Catania R , 1971 Localisation des cellules neurosécrétrices dans le complexe céphalique de *Crepidula fornicata Phil.* (Mollusque Gastéropode Prosobranche). *Haliotis* **1**. 1-2.

Catania R , 1973 Les cellules neurosécrétrices et leur localisation au cours du cycle vital dans le système nerveux central de *Crepidula fornicata* (Phil) Mollusque Gastéropode hermaphrodite. *Comptes Rendus Hebdomadaires de l'Académie des Sciences. Série D, Sciences Naturelles*, **276**. 801-804

Catania R , Fellman D & Lubet P , 1986 Localisation immunohistochimique de cellules sécrétrices à l'aide d'antisera de peptides de Vertébrés chez *Crepidula fornicata* Phil (Mollusque mésogastéropode). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série 3, Sciences de la Vie*, **303**: 749 – 754.

Danton E , Kiyomoto M , Komaru A , Wada K T., Awaji M. & Mathieu M., 1996. Comparative analysis of storage tissue and insulin-like neurosecretion in diploid and triploid mussels *Mytilus galloprovincialis LMK* in relation to their gametogenesis cycle. *Invertebrate Reproduction and Development* **29**(1) 37-46

Gabe M., 1955. Particularités des cellules neurosécrétrices chez quelques lamellibranches. *Comptes-Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* **240**: 1810-1812.

Gabe M. & Rancurel P , 1958 Caractères histologiques des cellules neurosécrétrices chez quelques Teredo *Bulletin de l'Institut Français d'Afrique Noire* **20**(A): 73-78.

Giard W , Lebel J-M., Boucaud-Camou E & Favrel P , 1998. Effects of vertebrate growth factors on digestive gland cells from the mollusc *Pecten maximus* L., an in vitro study *Journal of Comparative Physiology* **168** 81-86

Gomot A , Aleya L & Marchand C R., 1997. Contrôle neuroendocrine de la croissance des escagots intérêts pour l'étude de la neurotoxicité par les métaux lourds. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie*, **18**(1): 1- 8

Gomot A , Gomot L , Marchand C R , Colard C , & Bride J., 1992. Immunocytochemical localization of insulin related peptides in the central nervous system of the snail *Helix aspersa* Muller Involvement in growth control *Cellular & Molecular Neurobiology* **12**. 21 32

Gubicza A & Nagy Imre Z S , 1965. Histological examination of the ganglions in the Fresh water Mussel with impregnation methods *Anodonta cygnea* L *Annales Instituti Biologici (Tihany) Hungaricae Academiae Scientiarum* **32**: 11-15

Henry M., Benlimmame N., Bellhsen O.K., Jule Y. & Mathieu M., 1995. Immunohistochemical localisation of FMRFamide-containing neurons and nerve fibers in the ganglia and the gonad wall of the Scallop *Pecten maximus* (L.). *Neuropeptides* **28**: 79-84.

Id Halla M., 1997. Etude de la biologie des moules *Perna perna* (Linné 1758) et *Mytilus galloprovencalis* (Lamarck 1819) dans la baie d'Agadir. Thèse de Doctorat de 3ème cycle, Université Ibnou Zohr, Agadir, 157 p.

Id Halla M., Bouhaimi A., Zekhnini A., Narbonne J. F., Mathieu M. & Moukrim A., 1997. Etude du cycle de reproduction de deux moules *Perna perna* (Linné, 1758) et *Mytilus galloprovencalis* (Lamarck 1819) dans la baie d'Agadir (Sud du Maroc). *Haliotis* **26**: 51-62.

Illanes-Bucher J., 1979. Recherches cytologiques et expérimentales sur la neurosécrétion de la moule *Mytilus edulis* L. Thèse de Doctorat de 3e cycle, Université de Caen. 134 p., 7pl.

Illanes-Bucher J. & Lubet P., 1980. Etude expérimentale de l'activité neurosécrétrice au cours du cycle sexuel annuel de la moule *Mytilus edulis* L. (Mollusque Lamellibranche). *Bulletin de la Société Zoologique de France* **105**(1): 141-145.

Kaaya A., Najimi S., Ribera D., Narbonne J.F. & Moukrim A., 1999. Characterization of Glutathione S-transferases (GST) Activities in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincalis*- used as biomarker of pollution in the Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **62**(5): 623-929.

Kellner-Cousin K., Mialhe E. & Mathieu M., 1994. Identification of Insulin-like peptides in cerebral ganglia neurosecretory cells of the Mussel *Mytilus edulis*. *Tissue and Cell* **26**(6): 891-899.

Kellner K., Heude-Berthelin C. & Mathieu M., 2002. Immunocytochemical demonstration of glucagon-like peptides in *Mytilus edulis* cerebral ganglia and an in vitro effect of vertebrate glucagon on glycogen metabolism. *Tissue and Cell* **34**(2): 109-116.

Kits K.S., De Vries N.J. & Edderink R.H.M., 1990. Molluscan insulin related neuropeptide promotes neurite outgrowth in dissociated neuronal cell cultures. *Neurosciences Letters* **109**: 253-258.

Lebel J-M., Giard W., Favrel P. & Boucaud-Camou E., 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biology of the Cell* **86**(1): 67-72.

Lenoir F. & Mathieu M., 1986. Utilisation de cultures de cellules dissociées dans l'étude des contrôles exercées sur la gamétogenèse chez la moule *Mytilus edulis* L. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série 3, Sciences de la Vie*, **300**: 523-528.

Lenoir F., 1989. Mise au point de techniques de purification et de cultures cellulaires chez la moule. Application à l'étude des régulations du métabolisme du glucose et du glycogène. Thèse de Doctorat de Spécialité, Université de Caen, 1-130.

Lenoir F., Robbins L., Mathieu M., Lubet P. & Gabbott P.A., 1989. Isolation, characterisation and glucose metabolism of glycogen cells (= vesicular connective tissue cells) from the labial palps of the marine mussels. *Marine Biology* **101**: 495-501.

Leonel R.M.V., Umiji S. & Castro R.R.L., 1981. Neurossecreção em *Perna perna* (Linné, 1758) (Mollusca-Bivalvia) I. Aspectos citoquímicos e morfologicos dos pericanos basofilos do ganglio cerebroide pp. 367-383, in Seminario de Biologia Marinha (São Paulo, 9-15 fev 1980). Academia Brasileira de Ciências.

Lubet P., Mathieu M & Lenoir F, 1987 Contrôle endocrinien de la reproduction chez les Mollusques Bivalves. *Océanis* **13,** 3: 291-304.

Lubet P & Streff W, 1982 Contrôle neuroendocrine de la reproduction chez les Mollusques *Journal de Physiologie, Paris*, **78**. 537 – 542.

Lubet P & Alaoui N, 1987 Limites létales et leurs effets biologiques chez la moule *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Haliotis* **16**: 309-316

Lubet P & Mathieu M 1978 Experimental studies of the control of annual reproductive cycle, in Pelecypod Molluscs Abstracts, 9th Conference of European Comparative Endocrinologists *General and Comparative Endocrinology* **34**. 109.

Lubet P & Mathieu M, 1990 Les régulations endocriniennes chez les mollusques bivalves *Année Biologique* **29** 235-252.

Lubet P, 1955. Cycle neurosécrétoire de *Chlamys varia* L et *Mytilus edulis* L. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences* **241**: 119-121

Lubet P., 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les *Mytilidés* et les *Pectinidés* (Mollusques Bivalves). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes* **23**(3): 387 548.

Lubet P, 1966 Essai d'analyse expérimentale des perturbations produites par les ablations de ganglions nerveux chez *Mytilus edulis* L et *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Moll. Lamellibranches) *Annales d'Endocrinologie* **27**: 353-365.

Lunetta J E, 1969 Fisiologia da reproduçao dos mexilhoes (*Mytilus perna*, Mollusca Lamellibranchia) *Boletim de Zoologia e Biologia Marinha, Universidade de São Paulo*, nova serie **26**. 33-111.

Mathieu M. & Lubet P, 1982 The action of internal factors on gametogenesis in Pelecypods Molluscs *Malacologia* **22**:131-136

Mathieu M & Van Minnen J, 1989 Mise en évidence par immunocytochimie de cellules neurosécrétrices peptidergiques dans les ganglions cérébroïdes de la moule *Mytilus edulis* L. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série III, Sciences de la Vie*, **308**: 489-494.

Mathieu M, 1985. Partial characterization of aspartate transcarbamylase from the mantle of mussel (*Mytilus edulis* L.) (Moll. Bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology* **82B**(4): 667-674

Mathieu M., 1987a. Utilisation of ATCase activity in the study of neuroendocrine control of gametogenesis in *Mytilus edulis* (Moll Bivalvia) *Journal of Experimental Zoology* **241**(2) 247 252

Mathieu M., 1987b Etude expérimentale des contrôles exercés par les ganglions nerveux sur la gamétogénèse et les processus métaboliques associés chez la moule *Mytilus édulis* L (Mollusque Lamellibranche). *Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles*, Université de Caen, 1-205, 31 fig., 4 pl

Mathieu M, Lenoir F & Robbins I, 1988 A gonial mitosis stimulating factor in cerebral ganglia and hemolymph of the marine mussel *Mytilus edulis*. *General and Comparative Endocrinology* **72** 257-263

Mathieu M., Robbins I & Lubet P., 1991 The neuroendocrinology of *Mytilus edulis*. *Aquaculture* **94**: 213-223.

Mathieu M, 1994. Endocrine control of carbohydrate metabolism in Molluscs In Davay, K G, Peter, R.E & Tobe, S S (eds.), Perspectives in comparative endocrinology NRCC, Ottawa. 471-474

Moukrim A., Kaaya A, Najimi S, Roméo M & Gnassia-Barelli M., 2000 Assessment of the trace metals level in two species of mussels of the Agadir marine bay (South of Morocco) *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **65**: 478-485

Mounzih K. & Griffond B., 1992. Isolation of FMRFa-like peptides from the DB containing connective tissue of *Helix aspersa*. *Peptides* **13**: 423-427.

Nagabushanam R., 1963. Neurosecretory cycle and reproduction. *Indian Journal of Experimental Biology* **1**. 161-162.

Najimi S., Bouhaimi A., Daubeze M., Zekhnini A., Pellerin J., Narbone J.F. & Moukrim A., 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **58**: 901-908.

Pazos A.J. & Mathieu M., 1999. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on the cell suspensions of marine Bivalve gonad: Stimulation of gonial DNA synthesis. *General and Comparative Endocrinology* **113**: 112-120.

Robbins I., Lenoir F.& Mathieu M., 1990. A putative neuroendocrine factor that stimulate glycogen mobilisation in isolated glycogen cells of the marine mussel *Mytilus edulis*. *General and Comparative Endocrinology* **79**: 123-129.

Schot L.P.C., Boer H.H., Swaab D.F. & van Noorden S., 1981. *Cell and Tissue Research* **216**. 273-291.

Smit A.B., Vreugdenhil R.H.M., Geraerts W.P.M., Klootwijk J. & Joosse J., 1988. Growth-controlling molluscan neurons produce the precrsor of an insulin-related peptide. *Nature* **331**. 535-538.

Toullec J.Y., Lenoir F., Van Wormhoudt A. & Mathieu M., 1989. Approche expérimentale du contrôle de la croissance chez les bivalves. *Oceanis* **15**: 511-517.

Toullec J.Y., Robbins I. & Mathieu M., 1992. The occurrence ad in vitro effects of molecules potentially active in the control of growth in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *General and Comparative Endocrinology* **86**: 424-432.

Tsuneki K., 1974. Histochemical study of the neurosecretorion in the Mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of the Faculty of Science*, The University of Tokyo, sec. IV, **13**(2): 159 –173.

Umiji S. 1964. Neurosecreção em *Mytilus perna*. *Boletim de Facultade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo*, **324**: 181- 254.

Umiji S. 1969. Neurosecreção em *Mytilus perna* (Molusco-Lamelibrânquio). *Boletim de Zoologia e Biologia Marinha, Unviersidade de São Paulo*, **29**: 181-254.

Utilisation de cultures primaires de cellules de manteau d'ormeau (*Haliotis tuberculata*) pour l'étude de la synthèse *in vitro* de la matrice extracellulaire et de la biominéralisation

Jean-Marc PONCET[1], *Antoine SERPENTINI*[1], *Eve BOUCAUD-CAMOU*[1] *et Jean-Marc LEBEL*[1]

ABSTRACT

Use of mantle cell primary cultures from abalone (*Haliotis tuberculata)* to study *in vitro* extracellular matrix synthesis and biomineralization

The *in vitro* study of nacreous Gastropod *Haliotis tuberculata* biomineralization has not only an obvious interest for pearl culture, but has also a biomedical application, nacre proving bioacceptable and osteoinductive Dissociated mantle cells show stable MTT reduction and tritiated leucine incorporation rates during at least a week Thus, such a cell culture model seems to be suitable for *in vitro* study of proteoglycan (PGs) and collagen syntheses as potentially mineralizable matrix components After incubation of cultures with radiolabelled precursors (tritiated glucosamine and tritiated proline) and specific enzymatic or chemical degradations, it was showed that mantle cells were able to produce PGs and hyaluronic acid (HA), respectively 37% and 12% of glucosamine labelled macromolecules, and even collagen (4 5% of the whole protein synthesis) The establishment of a sequential relation between the synthesis of these components and the expression of biomineralization specific enzymes such as alcaline phosphatase or carbonic anhydrase, could specify their involvement in shell building process

RÉSUMÉ

L'étude *in vitro* de la biominéralisation chez le Gastéropode nacrier *Haliotis tuberculata* présente un intérêt évident pour la perliculture, mais aussi dans le domaine biomédical, la nacre s'étant avérée à la fois biocompatible et ostéoinductrice Les cellules dissociées de manteau maintiennent en culture des taux de réduction du MTT et d'incorporation de leucine tritiée à un niveau constant durant au moins une semaine Ce modèle de culture apparaît par conséquent adapté pour l'étude de la synthèse *in vitro* des protéoglycannes (PGs) et du collagène comme composants matriciels potentiellement minéralisables Suite

[1] Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines – IBBA Université de Caen – Esplanade de la Paix – F 14032 Caen cedex, France

à une incubation des cultures en présence de précurseurs radioactifs : la glucosamine tritiée et la proline tritiée - suivis de clivages chimiques ou enzymatiques spécifiques, il est montré que les cellules de manteau élaborent plusieurs catégories de PGs et de l'acide hyaluronique (AH), respectivement 37% et 12% des macromolécules glycosaminées, ainsi que du collagène (4,5% de l'ensemble des protéines). L'établissement d'une relation séquentielle entre la biosynthèse des ces composants et l'expression d'enzymes impliquées lors de la biominéralisation, telles que la phosphatase alcaline et l'anhydrase carbonique, permettrait de préciser leur implication dans le processus de formation de la coquille.

INTRODUCTION

Outre son intérêt fondamental, l'étude *in vitro* des premières étapes du processus de biominéralisation chez le Gastéropode nacrier *Haliotis tuberculata* est motivée par de nombreuses applications potentielles. Les recherches sur les mécanismes de biosynthèse de la nacre, non seulement intéressent le domaine de la perliculture, mais suscitent aussi un grand intérêt médical. Il a effectivement été montré que la nacre présentait des propriétés attractives et stimulantes sur des ostéoblastes humains, induisant une sécrétion *in vitro* de matrice organique suivie d'un dépôt d'apatite (Lopez *et al.*, 1992). Des effets similaires ont pu être observés *in vivo*; ainsi, de la nacre implantée sous forme de fragments dans des tissus osseux de Mammifères s'est révélée à la fois biocompatible et ostéoinductrice (Atlan *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 2000), suggérant des applications très prometteuses dans le domaine de la réparation osseuse.

La minéralisation naturelle d'un tissu consiste en un dépôt minéral sur une trame organique préalablement secrétée, et correspond à une séquence d'évènements bien précise qui a été mise en évidence chez les Vertébrés (Stein et Lian, 1993; Aubin, 1998). La matrice extracellulaire joue un rôle primordial lors de la nucléation, de l'orientation et de l'accroissement des minéraux (Boskey, 1996). Chez les Mollusques, cette matrice organique est essentiellement constituée de chitine (Falini *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2000), mais elle comprend aussi de nombreuses de protéines solubles (Weiner et Hood, 1975; Wheeler *et al.*, 1981; Miyamoto *et al.*, 1996, Weiss *et al.*, 2000, 2001). Parmi ces composants matriciels, des protéoglycannes (PGs) qui, outre leur rôle dans la séquestration et le transport du calcium vers l'espace extrapalléal (Hovingh et Linker, 1993; Kim *et al.*, 1996), ont été décrits dans la coquille du Gastéropode *Biomphalaria glabrata* (Marxen *et al.*, 1998). Par ailleurs, le collagène, très impliqué dans la constitution des tissus osseux, est présent notamment sous la forme d'un domaine de la lustrine A au niveau de la couche nacrée de la coquille chez *Haliotis refescens* (Shen *et al.*, 1997), tandis qu'une molécule sensible à la collagénase a été mise en évidence dans la nacre de l'ormeau (Schäffer *et al.*, 1997).

S'intégrant dans les recherches sur la croissance et la formation de la coquille chez les Mollusques, la néosynthèse de PGs et de collagène, potentiellement constitutifs de la trame organique préalable au dépôt minéral, est étudiée chez l'ormeau à l'aide d'un modèle de culture de cellules de manteau.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux

Les ormeaux utilisés (10 ± 1 cm) sont pêchés sur la côte Nord du Cotentin et sont maintenus en élevage au Centre Régional d'Etude Côtière (Luc sur Mer, Calvados) durant plusieurs semaines dans des structures en permanence renouvelées en eau de mer naturelle. Ils sont régulièrement nourris à l'aide d'un mélange d'algues locales fraîchement récoltées.

Cultures cellulaires

Après dissection et décontamination, les manteaux ont subi une dissociation à l'aide d'un mélange de protéases et de collagénase (0,1%) selon le protocole précédemment décrit (Poncet *et al.*, 2000) Les cellules obtenues sont ensemencées à raison de 150.10^3 par cm^2 dans le milieu élaboré pour la culture de cellules circulantes d'ormeau (Lebel *et al.*, 1996). Les cultures sont maintenues à 15°C à l'obscurité, et afin de renouveler partiellement le milieu, le volume initial est augmenté de 50% tous les 3 jours.

Tests de viabilité

Le test colorimétrique de réduction du MTT (Sigma) (Mosmann *et al.*, 1983) révèle l'activité des déshydrogénases mitochondriales des cellules. Les cultures sont incubées durant 24 heures en présence de 10% d'une solution de MTT (5 mg/ml). Un volume d'isopropanol acidifié par 0,04 N de HCl est alors ajouté aux cultures. La DO de l'échantillon est mesurée à 570 nm, avec soustraction du bruit de fond mesuré à 630 nm (Domart Coulon *et al.*, 1994; Lebel *et al.*, 1996).

Le taux de synthèse protéique est estimé par la mesure de l'incorporation de leucine tritiée. Les cultures sont incubées durant 24 heures en présence de 0,8 µCi/ml de [^{3}H] leucine (NEN, activité spécifique: 179 Ci/mmol). La réaction est stoppée par précipitation des cellules à l'aide de TCA (Sigma) à 5% en concentration finale. Après centrifugation des échantillons précipités, les culots sont rincés au TCA (10%), et la radioactivité incorporée dans les protéines néosynthétisées est mesurée au compteur à scintillation.

Dosage des protéoglycannes

Les cultures cellulaires reçoivent, 24 heures après l'ensemencement, 4 µCi/ml de [^{3}H]-D-glucosamine (NEN, activité spécifique: 23 Ci/mmol) qui est incorporée dans les ramifications glycosaminoglycannes (GAGs) au cours de la néosynthèse des PGs (Conrad *et al.*, 1977; Thiébot *et al.*, 1997). Après 48 heures d'incubation, les cultures sont additionnées d'un volume de tampon TUT (Tris pH 7,2: 50 mM, Urée: 4 M, Triton: 0,5%, NaN_3: 0,02%, EDTA: 10 mM, acide 6 hexamino-caproique: 100 mM, PMSF: 0,2 mM) doublement concentré (Thiébot *et al.*, 1997). Après extraction complète, l'échantillon est dialysé à 4°C contre 50 volumes d'eau distillée, puis chargé sur colonne échangeuse d'ions (DEAE, Sigma), le caractère anionique des PGs favorisant leur maintien sur la résine. Les PGs sont alors progressivement élués par un gradient linéaire de NaCl (0 à 1,2 M), tandis que le volume total de l'élution (58 ml) est collecté en fractions de 1 ml. La radioactivité de chacune des fractions est mesurée au compteur à scintillation, et le chromatogramme obtenu permet d'estimer la densité de charges des PGs néosynthétisés.

Les PGs ainsi purifiés sont repris et soumis à des digestions spécifiques. L'ensemble des PGs est clivé par le borohydrure alcalin (Carlson, 1968; Cambiazo et Inestrosa, 1990). Les PGs à héparane sulfates (HS-PGs) sont dépolymérisés à l'aide d'acide nitreux (Shively et Conrad, 1976; Dietrich *et al.*, 1985). Les PGs à dermatane ou à chondroïtne sulfate (DS/CS-PGs) sont digérés par la chondroïtinase ABC (EC 4.2.2.4, Sigma, 1 U/ml) (Hovingh et Linker, 1993; Thiébot *et al.*, 1997, Kimura *et al.*,1999). En marge des PGs au sens strict, l'acide hyaluronique (AH), qui est un GAG de haut poids moléculaire, est digéré spécifiquement par la hyaluronidase de *Streptomyces* (EC 4.2.2.1, Sigma, 3 U/ml) (Locci *et al.*, 1992; Thiébot *et al.*, 1997).

Les PGs/GAGs ainsi digérés sont injectés en chromatographie d'exclusion (Superose 6, Pharmacia). La comparaison des chromatogrammes obtenus par rapport à celui d'un témoin natif, permet une évaluation de la proportion des différentes familles de PGs néosynthétisés parmi l'ensemble des macromolécules marquées par la glucosamine.

Dosage du collagène

Les cultures cellulaires reçoivent, 24 heures après l'ensemencement, 0,8 µCi/ml de [^{3}H]-L-proline (NEN, activité spécifique: 80 Ci/mmol), ainsi que 300 µM d'ascorbate et 200 µM de β-aminopropionitrile. Après 48 heures d'incubation, les cultures sont reprises et centrifugées (5 000 g). Les culots, après rinçages au tampon Tris pH 7,6 $CaCl_2$ 10 mM, sont soumis à l'action de la collagénase de *Clostridium* (EC 3.4.24.3, Worthington) durant 17 heures à 37°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés et rincés au TCA 10% (Serpentini *et al.*, 2000). Le taux de collagène synthétisé est alors estimé, en utilisant l'équation de Peterkofsky et Diegelmann (1971), par la différence entre la quantité de radioactivité contenue dans des échantillons avant et après action de la collagénase.

RÉSULTATS

Viabilité cellulaire

Le métabolisme protéique des cellules de manteau en culture est suivi par le taux d'incorporation de leucine marquée. Il s'avère qu'aucune variation significative par rapport à la mesure effectuée au moment de l'ensemencement n'est enregistrée. Effectivement, le taux d'incorporation atteint 2 869 ± 296 DPM par culture après 6 jours, contre 2 418 ± 104 DPM lors de l'initiation (Figure 1).

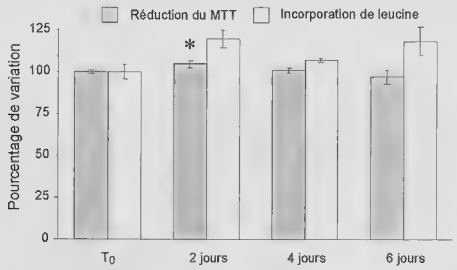


Figure 1. Les cellules dissociées sont ensemencées dans des puits de 9,4 cm². Des mesures d'incorporation de leucine tritiée et de réduction du MTT sont effectuées dès l'ensemencement, puis après 2, 4 et 6 jours de culture. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux valeurs enregistrées à T_0. Les erreurs standard sont calculées à partir des résultats de trois cultures. Le degré de significativité par rapport aux valeurs enregistrées à T_0 est calculé par le test *t* de Student: $p < 0,05$ (*)

L'activité mitochondriale, évaluée par le test de réduction du MTT, présente une grande stabilité. Si, en corrélation avec une hausse de l'incorporation d'acides aminés, une augmentation significative est enregistrée à J_2, elle ne correspond qu'à une élévation de 4,8% de la DO. La valeur obtenue après 6 jours de culture représente 97,1% de celle observée à T_0.

Synthèse des PGs

Le profil d'élution sur colonne échangeuse d'ions des extraits de cultures incubées en présente de glucosamine tritiée révèle un pic de radioactivité élué par une faible concentration saline (entre 0,1 et 0,2 M de NaCl, Figure 2). Ce pic se décompose en deux parties, la plus importante est récupérée par 0,11 M de NaCl (I), tandis que la seconde, plus discrète, est retardée de trois fractions (0,18 M, II). Ces résultats indiquent que les PGs néosynthétisés par les cellules de manteau sont faiblement anioniques, et corrélativement sous-sulfatés. Les fractions correspondant au pic de radioactivité sont reprises et soumises à des digestions spécifiquement dirigées contre les grandes catégories de PGs, avant d'être passées en chromatographie d'exclusion. Il apparaît ainsi que les PGs au sens strict représentent 37 + 3% de l'ensemble des macromolécules glycosaminées. Parmi ces PGs, les HS-PGs et les CS/DS PGs totalisent respectivement 13,8 + 3,7% et 11,3 ± 3,2% des molécules marquées (Figure 3). Les autres PGs (12,3 + 0,9%), résistant à la fois à la chondroïtinase et à l'acide nitreux, appartiennent à une ou plusieurs catégories dont la nature reste à déterminer. Par ailleurs, il s'avère que 11,8 ± 3,8% des molécules glycosaminées produites *in vitro* par les cellules de manteau correspondent à de l'AH.

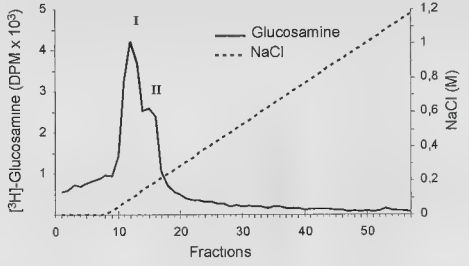


Figure 2. Les cellules dissociées sont ensemencées dans quatre unités de culture de 75 cm². Après une incubation de 48 heures en présence de glucosamine tritiée (4 µCi/ml), l'échantillon, obtenu par extraction des cultures au tampon TUT, est dialysé et chargé sur colonne échangeuse d'ions. 58 fractions de 1 ml sont collectées par élution sous gradient linéaire de NaCl (0 à 1,2 M) la quantité de ^3H contenue dans 50 µl de chaque fraction est mesurée au compteur à scintillation.

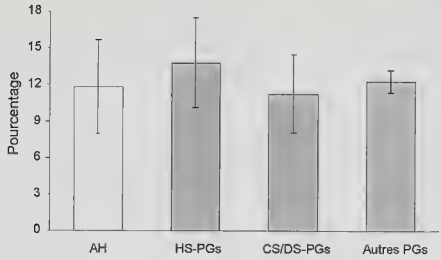


Figure 3. Les échantillons préalablement purifiés en chromatographie échangeuse d'ions sont soumis, indépendamment, aux dégradations spécifiques décrites avant d'être injectés en chromatographie d'exclusion. Les résultats sont exprimés en pourcentage de dégradation résultant de chacune des attaques chimiques ou enzymatiques décrites. Les erreurs standard sont calculées à partir des résultats de quatre chromatographies au minimum.

Synthèse de collagène

La différence entre la quantité de proline marquée incorporée dans l'ensemble des protéines et la quantité de proline mesurée dans les protéines résistantes à la collagénase, permet d'évaluer à 4,5 ± 0,8% le taux de collagène rapporté à l'ensemble des protéines néosynthétisées (Figure 4).

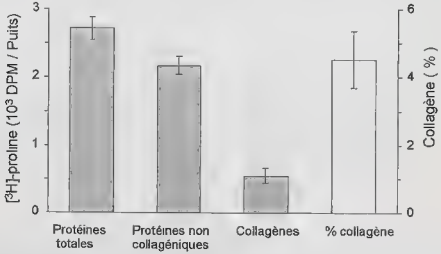


Figure 4. Les cellules dissociées sont ensemencées dans des puits de 9,4 cm². Après incubation de 48 heures en présence de proline tritiée (0,8 µCi/ml), les échantillons sont soumis, contre témoins, à l'action de la collagénase de *Clostridium*. Le pourcentage de collagène néosynthétisé parmi l'ensemble des protéines est calculé par différence entre la quantité totale de protéines et la quantité de protéines résistantes à la collagénase. Les erreurs standard sont calculées à partir des résultats de trois cultures.

DISCUSSION

De nombreux exemples de cultures de cellules d'Invertébrés marins ont été décrits (Rinkevitch, 1999). Chez les Mollusques, de nombreux modèles comme les cultures de cellules cardiaques (Wen *et al.*, 1993; Boulo *et al.*,1996 Le Marrec-Croq *et al.*, 1999), digestives (Robledo et Cajaraville, 1997), palléales (Toullec *et al.*, 1988; Giard *et al.*, 1998), circulantes (Lebel *et al.*, 1996), ou encore branchiales (Auzoux *et al.*, 1993) ont été développés. Toutefois, les exemples de proliférations cellulaires demeurent exceptionnels (Macchi et Wada, 1989; Kusumoto *et al.*, 1997) Si aucune mitose n'a été observée au niveau des cultures de cellules de manteau d'ormeau, en revanche l'activité métabolique résultante reste stable durant au moins une semaine, permettant l'étude de la synthèse *in vitro* de composants matriciels potentiellement minéralisables.

La synthèse de PGs et/ou de GAGs est nécessaire aux processus d'organisation tissulaire chez tous les Métazoaires (Cassaro et Dietrich, 1977; Oliveira *et al.*, 1994). Les cellules de manteaux produisent *in vitro* plusieurs catégories de PGs faiblement anioniques, ainsi que de l'AH. La synthèse de tels composants n'avait encore jamais été décrite au niveau de cultures cellulaires de Mollusques. Conformant ces résultats, des HS-PGs et des CS-PGs ont été simultanément extraits chez des Mollusques (Dietrich *et al.*, 1983; Hovingh et Linker, 1998). La présence d'AH dans les groupes inférieurs aux Cordés, en revanche apparaît controversée (Cassaro et Dietrich, 1977; Nader *et al.*, 1996). Cependant, une protéine de liaison de l'AH a été mise en évidence dans le cartilage crânien d'un calmar (Tsilemou *et al.*, 1998), ce qui, non seulement suggère l'existence de l'AH chez les Mollusques, mais permet aussi d'envisager son implication dans le processus de biominéralisation. Si le degré de sulfatation et par conséquent la charge globale de ces composants augmentent au cours l'ontogenèse (Nader *et al.*, 1996), de même qu'avec la salinité des biotopes (Nader *et al.*, 1983), des PGs et des GAGs faiblement anioniques ont toutefois été décrits chez des Mollusques marins (Karamanos *et al.*, 1992; Jordan et Marcum, 1996). En outre, les paramètres physico-chimiques rencontrés par des cellules isolées en culture sont très différents de ceux qui prévalent dans le tissu originel, une synthèse de PGs peu chargés, davantage caractéristiques des tissus embryonnaires, n'est pas alors inconcevable. Enfin, environ un tiers des PGs néosynthétisés n'a pu être identifié par les traitements décrits, il pourrait s'agir, en partie au moins, de PGs à kératane sulfate dont la présence est supposée chez plusieurs espèces de Mollusques et de Crustacés (Nader *et al.*, 1983).

Par ailleurs, les cellules de manteau en culture ont élaboré, durant les 48 heures d'incubation, un taux de collagène égal à 4,5% par rapport à l'ensemble des protéines. Cette proportion est en concordance avec les résultats obtenus par Benson *et al.* (1990), durant les premières phases de la spiculogenèse chez l'oursin. Des collagènes on été mis en évidence chez plusieurs espèces de Mollusques (Sivakumar et Chandrakasan, 1998; Yoneda *et al.*, 1999), tandis qu'une protéine matricielle sensible à la collagénase est présente au niveau de la coquille chez un ormeau (Schäffer *et al.*, 1997).

Ces résultats montrent la capacité des cellules de manteau d'ormeau à produire *in vitro* différentes catégories de composants matriciels Si le rôle respectif des PGs et des collagènes au cours de la formation de la coquille chez les Mollusques n'a pas été précisément défini, ces éléments semblent toutefois indissociables des processus de la biominéralisation. La stimulation ou l'inhibition de leur biosynthèse, en relation avec l'activité d'enzymes marqueurs de la biominéralisation, telles que la phosphatase alcaline ou l'anhydrase carbonique, permettrait d'élucider leur degré d'implication dans la séquence des évènements conduisant à la synthèse de la coquille.

BIBLIOGRAPHIE

Aubin J E , 1998 Advances in the osteoblast lineage *Biochemistry and Cell Biology* **76**: 899-910

Auzoux S , Domart-Coulon I & Doumenc D., 1993 Gill cell cultures of the butterfish clam *Ruditapes decussatus*. *Journal of Marine Biotechnology* **1**: 79-81.

Atlan G., Delattre O , Berland S., LeFaou A., Nabias G , Cot D & Lopez E , 1999 Interface between bone and nacre implants in sheep. *Biomaterials* **20**. 1017-1022

Benson S , Smith L , Wilt F & Shaw R 1990 The synthesis and secretion of collagen by cultured sea urchin micromeres. *Experimental Cell Research* **188**: 141-146.

Boskey A L , 1996 Matrix proteins and mineralization: an overview *Connective Tissue Research* **35** 357-363

Boulo V , Cadoret J P , Le Maurec F., Dorange G & Mialhe E., 1996 Transient expression of luciferase reporter gene after lipofection in oyster (*Crassostrea gigas*) primary cell cultures *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **5**: 167-174.

Cambiazo V & Inestrosa N C , 1990 Proteoglycan production in *Drosophila* egg development effect of β-D-xyloside on the proteoglycan synthesis and larvae motility. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry* **97**. 307-314

Carlson D M , 1968 Structure and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *Journal of Biological Chemistry* **243**: 616-626.

Cassaro C M & Dietrich C P , 1977 Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates *Journal of Biological Chemistry* **252**: 2254-2261.

Conrad G W , Hamilton C & Haynes E., 1977 Differences in glycosaminoglycans synthesized by fibroblast-like cells from chick cornea, heart, and skin *Journal of Biological Chemistry* **252**: 6861-6870

Dietrich C P , Paiva V M , Jerônimo S.M , Ferreira T.M., Medeiros M G , Paiva J F & Nader H B., 1983 Characteristic distribution of heparan sulfates and chondroitin sulfates in tissues and organs of the Ampullariidae *Pomacea sp. Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry* **76** 695 698

Dietrich C P., Paiva J.F , Moraes C T , Takahashi H K , Porcionatto M A & Nader H.B., 1985 Isolation and characterisation of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliana Biochimica et Biophysica Acta* **843**: 1-7.

Domart-Coulon I , Doumenc D , Auzoux Bordenave S & Le Fichant Y., 1994 Identification of media supplements that improve the viability of primary cell culture of *Crassostrea gigas* oysters. *Cytotechnology* **16**. 109-120.

Fahmi G , Albeck S , Weiner S. & Addadi L , 1996. Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science* **271**: 67-69.

Giard W., Lebel J-M , Boucaud Camou E & Favrel P., 1998 Effects of vertebrate growth factors on digestive gland cells from the mollusc *Pecten maximus* L an in vitro study *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **168**: 81 86

Hovingh P. & Linker A , 1993 Glycosaminoglycans in *Anodonta californiensis*, a freshwater mussel *Biological Bulletin* **185**. 263-276

Hovingh P. & Linker A , 1998 Glycosaminoglycans in two mollusks, *Aplysia californica* and *Helix aspersa*, and in the leech, *Nephelopsis obscura Comparative Biochemistry and Physiology. B. Comparative Biochemistry* **119** 691-696

Jordan R.E & Marcum J A , 1986 Anticoagulantly active heparin from clam (*Mercenaria mercenaria*) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **248**: 690-695.

Karamanos N K., 1992 Two squid skin proteoglycans each containing chondroitin sulfates with different sulfatation patterns *Biochemistry and Cell Biology* **70**: 629-635

Kim Y S, Jo Y Y., Chang I.M, Toida T, Park Y & Linhardt R J, 1996 A new glycosaminoglycan from the giant african snail *Achatina fulica*. *Journal of Biological Chemistry* **271**. 11750-55.

Kimura S., Cheng J, Toyoshima K., Oda K & Saku T, 1999 Basement membrane heparan sulfate proteoglycan (perlecan) synthesized by ACC3, adenoid cystic carcinoma cells of human salivary gland origin. *Journal of Biochemistry* **125**: 406-413.

Kusumoto K, Shirahata S, Katakuta Y & Murakami H., 1997 Establishment of an abalone digestive gland cell line secreting various glycosidase in protein free culture *Cytotechnology* **24**: 169 175.

Le Marrec Croq F, Glaise D, Guguen Guillouzo C, Chesne C, Guillouzo A, Boulo V & Dorange G, 1999 Primary cultures of heart cells from the scallop *Pecten maximus* (Mollusca Bivalvia) *In Vitro Cellular and Developmental Biology, Animal*, **35**. 289-295.

Lebel J-M., Giard W, Favrel P & Boucaud Camou E, 1996 Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biology of the Cell* **86**. 67-72

Liao H, Munvei H, Sjostrom M., Hammarstrom L & Li J., 2000 Tissue responses to natural aragonite (*Margaritifera* shell) implants in vivo. *Biomaterials* **21**: 457-468

Locci P., Evangelisti R., Lilli C., Stabellini G., Becchetti E & Carinci P, 1992 An evaluation of the mechanisms developmentally involved on cellular an extracellular glycosaminoglycans accumulation in chick embryo skin fibroblasts. *The International Journal of Biochemistry* **24**: 151-158

Lopez E., Vidal B., Berland S, Camprasse S, Camprasse G & Silve C, 1992 Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained *in vitro*. *Tissue and Cell* **24** 667-679.

Machi A & Wada K T, 1989. Some marine invertebrates tissue culture. *In:* Invertebrate Cell System Applications. (Mitsuhashi, ed): 225-233

Marxen J C, Hammer M., Gehrke T & Becker W, 1998 Carbohydrates of the organic shell matrix and the shell-forming tissue of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) *Biological Bulletin* **194** 231-240

Miyamoto H, Miyashita T, Okushima M, Nakano S, Morita T & Matsushiro A, 1996 A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls *Proceedings of the National Academy of Science of USA* **93** 9657-9660.

Mosmann T, 1983 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods* **65**: 55-63

Nader H B, Medeiros M.G., Paiva J F, Paiva V M, Jerônimo S.M, Ferreira T M & Dietrich C P, 1983. A correlation between the sulfated glycosaminoglycan concentration and degree of salinity of the "habitat" in fifteen species of the classes Crutacea, Pelecypoda and Gastropoda *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry* **76**: 433-436

Nader H.B, Oliveira F W, Jerônimo S M, Chavante S F, Sampaio L O & Dietrich C P, 1996. Synchronized order of appearance of hyaluronic acid (or acidic galactan) → chondroitin C-6 sulfate → chondroitin C 4/C-6 sulfate, heparan sulfate, dermatan sulfate → heparin during morphogenesis, differentiation and development. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **29**. 1221-1226

Oliveira F W, Chavante S F., Santos E A, Dietrich C P & Nader H B., 1994. Appearance and fate of a β-galactanase, α,β-galactosidases, heparan sulfate and chondroitin sulfate degrading enzymes during embryonic development of the Mollusc *Pomacea sp. Biochimica et Biophysica Acta* **1200**: 241-246.

Peterkofsky B & Diegelmann R, 1971 Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagenin the presence of other proteins. *Biochemistry* **10**: 988-994

Poncet J M, Serpentini A, Thiébot B., Villers C, Bocquet J., Boucaud-Camou E & Lebel J M., 2000 *In vitro* synthesis of proteoglycans and collagen in primary cultures of mantle cells from the nacreous

Mollusk, *Haliotis tuberculata*: a new model for study of molluscan extracellular matrix. *Marine Biotechnology* **2**. 387-398

Rinkevich B , 1999. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *Journal of Biotechnology* **70**. 133-153

Robledo Y & Cajaraville M.P , 1997 Isolation and morphofunctional characterization of mussel digestive gland cells *in vitro*. *European Journal of Cell Biology* **72**. 362-369.

Schaffer T E , Ionescu-Zanetti C , Proksch R , Fritz M., Walters D A , Almqvist N , Zaremba C M , Belcher A M , Smith B L , Stucky G D., Morse D.E & Hansma P K., 1997. Does abalone nacre form by heteroepitaxial nucleation or by growth through mineral bridges? *Chemistry and Materials* **9** 1731 1740

Serpentini A , Ghayor C , Poncet J M., Hebert V , Galera P , Pujol J P , Boucaud-Camou E & Lebel J M , 2000 Collagen study and regulation of the *de novo* synthesis by IGF I in hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Journal of Experimental Zoology* **287**: 275-284.

Shen X , Belcher A M , Hansma P K , Stucky G D & Morse D E , 1997 Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 32472-481.

Shively J E & Conrad H E , 1976 Nearest neighbor analysis of heparin: identification and quantitation of the products formed by selective depolymerization procedures *Biochemistry* **15**: 3943-3950

Sivakumar P & Chandrakasan G , 1998 Occurence of a novel collagen with three distinct chains in the cranial cartilage of the squid *Sepia officinalis*: comparison with shark cartilage collagen *Biochimica et Biophysica Acta* **1381**. 161-169.

Stein G S & Lian J B , 1993 Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Review* **14** 424-442

Thiébot B , Bichoualne L., Langris M , Bonnamy P.J , Barbey P., Carreau S. & Bocquet J., 1997 IGF-I stimulates synthesis of undersulfated proteoglycans and of hyaluronic acid by peritubular cells from immature rat testis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1358**: 127-141.

Toullec J.Y., Chikhi M. & Van Wormhoudt A , 1992 In vitro protein and alpha amylase in F cells from hepatopancreas of *Palaemon serratus* (Crustacea; Decapoda). *Experientia* **48**. 272-277.

Tsilemou A , Giannicopoulou P. & Vynios D H , 1998 Identification of a protein in squid cranial cartilage with link protein properties. *Biochimie* **80**: 591-594.

Weiner S & Hood L , 1975. Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation. *Science* **190**. 987-989

Weiss I M , Kaufmann S., Mann K. & Fritz M , 2000. Purification an characterization of perlucin and pedusin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **267**. 17-21

Weiss I M., Gohring W , Fritz M. & Mann K., 2001. Perlustrin, a *Haliotis laevigata* (Abalone) nacre protein, is homologous to the insulin-like growth factor binding protein N terminal module of vertebrates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **285**: 244-249

Wen C M , Kou G.H & Chen S N , 1993 Cultivation of cells from the heart or the hard clam, *Meretrix lusoria* (Röding). *Journal of Tissue Culture Methods* **15**: 123-130.

Wheeler A P., George J.W. & Evans C A., 1981 Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science* **212**: 1397-1398

Yoneda C., Hirayama Y , Nakaya M., Matsubara Y , Ine S , Hatae K & Watanabe S , 1999 The occurence of two types of collagen: proα-chain in the abalone *Haliotis discus*: muscle *European Journal of Biochemistry* **261**: 714-721

Transport du glucose dans les cellules vésiculeuses d'huître creuse *Crassostrea gigas*

Kristell KELLNER[1], *Clothilde HEUDE-BERTHELIN*[1] *et Michel MATHIEU*[1]

RÉSUMÉ

Chez *Crassostrea gigas*, huître creuse du Pacifique, le cycle saisonnier de gestion des réserves sous forme de glycogène est très strictement corrélé au cycle de reproduction En effet, ce glycogène, stocké dans les cellules vésiculeuses du tissu de réserve, sert de support énergétique à la gamétogenèse Les travaux de Heude-Berthelin (2000) ont montré que le métabolisme du glycogène devait être soumis à une régulation stricte

La mise au point d'un test biologique *in vitro* utilisant un analogue non métabolisable du D-glucose, le 3-O-Méthyl-D-Glucose (3-OMeG) a permis de quantifier l'entrée brute de glucose dans les cellules vésiculeuses isolées L'effet de la concentration extracellulaire de 3-OMeG sur l'entrée de 3-OMeG montre l'existence de plusieurs composantes dans l'entrée de glucose dans la cellule une composante saturable avec la concentration en substrat et une composante de diffusion passive non saturable. Afin de mieux définir la composante saturable, l'effet d'un inhibiteur non spécifique des systèmes de transport facilités, la phlorétine, a montré que la composante de diffusion simple est négligeable aux concentrations physiologiques de glucose extracellulaire

Une recherche de transporteurs de type GluT (Glucose Transporteur) a été entreprise par des techniques immunologiques. En immunofluorescence indirecte avec un anticorps anti-GluT4 de vertébrés, un marquage est visualisé d'une part sur les cellules vésiculeuses dissociées, d'autre part sur des coupes de tissu de réserve

ABSTRACT

Glucose uptake into vesicular cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

In the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, the seasonal glycogen storage cycle is directly related to the annual reproductive cycle. Gametogenetic processes are based on the energetic supply provided by glycogen stored in vesicular cells of the gonadal area Glycogen metabolism was studied previously (Heude Berthelin, 2000) and it was proved to be strongly regulated.

The present work aims to consider glycogen metabolism regulation by evaluation the characteristics of glucose uptake in isolated storage cells We used the nonmetabolizable glucose analogue, 3 O-Methyl

[1] Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, Université de Caen, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen cedex, France. e-mail <kellner@sbba.unicaen.fr>

Glucose (3 OMeG) as a measure of glucose uptake The uptake profile shows two diffusion components a non saturable and a saturable ones, indicating that glucose uptake occurs in *Crassostrea gigas* by a carrier-mediated process.

The characteristics of glucose uptake were precised Moreover, process of glucose uptake was investigated by the use of phloretine, a non specific inhibitor of facilitate transport, revealing that glucose diffusion throughout the membrane is not significant at 0.5mM of 3 OMeG. These observations leads to consider the occurrence of glucose transporters (GluT) in *Crassostrea gigas* vesicular cells An indirect immunofluorescent strategy using an anti-vertebrate GluT4 reveals stained cells in dissociated cells preparations of labial palps as well as in tissue sections.

INTRODUCTION

Comme chez la plupart des bivalves, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* le glycogène contenu dans le tissu de réserve joue un rôle central comme support énergétique du métabolisme général et de la gamétogenèse (Bayne *et al.*, 1982; Gabbott et Whittle, 1986; Ruiz *et al.*, 1992; Mathieu et Lubet, 1993) Bien que la composition biochimique et en particulier le taux de glycogène aient été étudiés dans l'animal entier (Walne et Mann, 1975; Robert *et al.*, 1993), ou organe par organe (Berthelin *et al.*, 2000a), les mécanismes biochimiques de la mise en réserve et de la mobilisation du glycogène en relation avec l'activité de reproduction restent peu documentés en comparaison d'autres modèles comme la moule *Mytilus edulis*.

Chez *C. gigas*, au cours de l'année, le volume occupé par les tubules gonadiques est inversement proportionnel au volume occupé par le tissu de réserve dans la région gonadique (Berthelin *et al.*, 2000a) De plus, le taux de glycogène dans la région gonade manteau est élevé en automne et en hiver, pendant la période de repos sexuel au cours de laquelle le tissu de réserve se restructure. Au contraire, ce taux est bas pendant la période d'activité sexuelle, au printemps et en été (Berthelin *et al.*, 2000a). Enfin, un test biologique *in vitro* permettant d'évaluer l'incorporation du glucose dans le glycogène des cellules de réserve (Berthelin *et al.*, 2000b) a permis de montrer que, pour l'année du suivi, la synthèse de glycogène avait lieu essentiellement en hiver. Ces résultats montrent qu'au moins pour l'année suivie, la mise en réserve en vue de la gamétogenèse aurait lieu en période hivernale. La synthèse de glycogène ne pourrait alors être interprétée comme une réponse directe à une augmentation du taux de glucose circulant mais impliquerait l'existence de mécanismes d'entrée du glucose particulièrement efficaces, fonctionnant même pour de faibles concentrations de glucose circulant. Or, différents modes de passage du glucose à travers les membranes cellulaires (diffusion simple, diffusion facilitée et co-transport actif), ont été identifiés chez de nombreuses espèces de Vertébrés et d'Invertébrés et ont en outre été largement décrits chez la moule *Mytilus edulis* (Zaba *et al.*, 1981; Zaba et Davies, 1984; Pajor *et al.*, 1989; Lenoir, 1989 et Wright *et al.*, 1992). Les différents mécanismes de transport facilité font appel majoritairement à 2 systèmes de transport: des co transporteurs sodium glucose (SGLT) et des transporteurs spécifiques du glucose (GluT). La présence de SGLT a elle été mise en évidence au niveau des branchies et du manteau chez la moule *Mytilus edulis* (Pajor *et al.*, 1989; Loazzo *et al.*, 1993) et chez *Crassostrea gigas*, un effet de la concentration extracellulaire en sodium a été montré sur l'entrée de glucose au niveau des tissus branchiaux (Bamford et Gingles, 1974). Concernant les GluTs, leur existence a été prouvée chez plusieurs espèces d'invertébrés, (Fischer et Rasmuson Lestander, 1999, Skelly *et al.*, 1994, Rodriguez-Contreras *et al.*, 1998)

L'objectif de ce travail est de caractériser l'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses d'huîtres *Crassostrea gigas* et de mettre en évidence l'existence de transporteurs de glucose.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine des animaux

Les huîtres utilisées (*Crassostrea gigas*) proviennent d'un élevage localisé sur le site ostréicole de Saint-Vaast la Hougue dans la Manche. Elles sont maintenues en chambre froide et utilisées dans les deux jours suivant leur arrivée au laboratoire.

Conditions de stérilité

Le matériel de dissection et la verrerie nécessaires aux préparations cellulaires sont autoclavés et le milieu de culture filtré sur membrane millipore 0,2 µm. Toutes les étapes de la dissociation cellulaire sont réalisées sous hotte à flux laminaire.

Dissection et dissociation des palpes labiaux

La dissection et la dissociation cellulaire sont effectuées selon le protocole décrit par Berthelin *et al.* (2000b). La viabilité des cellules est vérifiée par le test M.T.T. (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényl tetrazolium bromide) décrit par Mosmann (1983), adapté aux cellules d'organismes marins par Coulon (1993) et mis au point sur les cellules de réserve chez *Crassostrea gigas* par Berthelin *et al.* (2000b).

Mesure de l'entrée de glucose dans la cellule de réserve: entrée de 3-O-Méthyl-D-glucose (3-OMeG)

L'entrée du glucose dans les cellules de réserve a été étudiée selon la technique utilisée chez *Mytilus edulis* par Lenoir (1989), avec un analogue du glucose, le 3-O-Méthyl-D-[U~^{14}C] glucose (ICN®, 50 mCi/mM), non phosphorylé par l'hexokinase, donc non métabolisable par les cellules.

Les suspensions de cellules de réserve sont incubées à 15°C dans des tubes stériles de 5 ml contenant:

400 µl de suspension de cellules de réserve (2,5 millions de cellules).

50 µl de 3 OMeG (en concentration variable).

50 µl de 3-OMe[U~^{14}C]G (0,2 µCi).

50 µl d'inhibiteur ou de milieu L_{15}.

Le 3 OMeG, le 3-OMe[U~^{14}C]G et l'inhibiteur sont préparés dans le milieu de culture L_{15} froid (4°C) contenant 0,3 mM de phlorétine. Le mélange est alors déposé au sommet d'un gradient discontinu de densité, constitué de deux couches coulées successivement dans des microtubes de 1,5 ml:

50 µl d'acide perchlorique en solution à 15% dans de l'eau bidistillée.

200 µl d'huile de silicone de densité 1,05 g/cm3.

Les tubes sont ensuite soumis à une centrifugation (30 secondes, 11000 g) pendant laquelle, après migration dans l'huile de silicone, les cellules atteignent la couche d'acide perchlorique et éclatent, libérant ainsi leur contenu cellulaire. La fraction supérieure du gradient est alors éliminée et les tubes sont rincés 3 fois avec 1 ml d'eau bidistillée afin d'éliminer la radioactivité résiduelle.

Après élimination de l'eau de lavage et d'une partie de l'huile de silicone par aspiration, le fond de chaque tube est découpé et placé dans une fiole de comptage contenant 4 ml de liquide de scintillation.

Pour chacune des expériences, une série de témoins sans incubation est réalisée, dans le but de déterminer la quantité de radioactivité non spécifiquement fixée. L'effet de la concentration en 3 OMeG sur le flux entrant est suivi en incubant les suspensions cellulaires pendant 45 minutes en présence de 3-OMeG à des concentrations variant de 0 à 64 mM.

La cinétique est réalisée pour des temps variant de 0 à 300 min à 0.5 mM de 3-OMeG

L'effet de la phlorétine a été testé à une concentration de 0,3 mM d'inhibiteur.

Analyses statistiques

Pour chaque test biologique, 6 réplicats par concentration testée ont été réalisés. Les données des tests biologiques sont analysées à l'aide d'un test paramétrique ou non paramétrique suivant leur distribution (Kruskal et Wallis), suivi d'un test de comparaison multiple (test Student Newman-Keuls) afin de déterminer les différences significatives entre les échantillons (Scherrer, 1984).

Immmunofluorescence indirecte

Les cellules dissociées de palpes sont préparées selon le même protocole que celui décrit pour le test biologique. Leur purification est également réalisée sur un gradient de Percoll. La fixation des cellules sur les lames se fait par cytocentrifugation des cellules dissociées pendant 10 minutes à 190 g. Les cellules sont ensuite fixées dans un bain d'acétone pendant 10 minutes. Les lames ainsi réalisées sont congelées et conservées à -80°C. Avant leur utilisation, les lames de cellules dissociées peuvent être placées pendant 5 minutes dans un bain de PBS additionné de 5% de Triton X-100 (traitement de perméabilisation cellulaire) puis elles sont rincées dans du PBS (bain de 5 minutes).

Les coupes à congélation de palpes sont préparées à partir de fragments d'environ $3mm^3$. Ces fragments sont soigneusement rincés à l'EMS (eau de mer stérile), puis placés pendant 12 h à 4°C dans 10 ml de solution de fixation: PBS avec 4% de paraformaldehyde. Après 3 bains successifs de 12 h dans 10 ml de PBS + saccharose 10%, puis PBS saccharose 10%, et PBS saccharose 30% -glycérol 5%, les fragments sont alors disposés dans une goutte de Tissutek et maintenus à 20°C pendant plusieurs heures. Des coupes de 7 µm sont ensuite réalisées dans les blocs et disposées sur les lames conservées à –80°C. Ces lames sont décongelées au moment de l'utilisation dans un bain de PBS et fixées dans l'acétone (bain de 10 minutes), puis rincées pendant 10 minutes dans du PBS.

L'anticorps primaire utilisé est un anticorps polyclonal de lapin anti-GluT 4 (H 61, Santa Cruz Biotechnology, Inc.); l'anticorps secondaire testé est un anticorps anti Ig G de lapin, couplé au F.I.T.C. (Sigma). Les dilutions des anticorps sont effectuées dans du PBS.

L'anticorps primaire dilués au 10^e est déposé puis les lames sont incubées pendant 1 h à température ambiante en chambre humide et rincées 2 fois 5 minutes dans du PBS. L'anticorps secondaire dilué au 100^e et additionné de bleu Evans 1 % est alors déposé. Après 2 nouveaux rinçages dans du PBS, les lames sont montées avec du tampon glycériné et conservées à l'obscurité, à –80°C.

RÉSULTATS

Effet de la concentration extracellulaire de 3-OMeG

L'effet de la concentration extracellulaire de 3-OMeG sur le flux entrant de 3-OMeG montre qu'il existe deux composantes dans le transport du glucose dans la cellule de réserve, une composante de diffusion passive et une composante saturable avec la concentration en substrat (Figure 1).

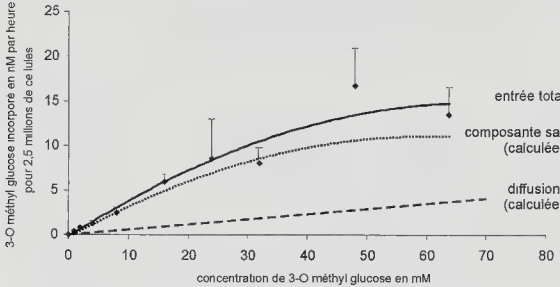


Figure 1 Effet de la concentration extracellulaire de 3-OMeG sur le flux entrant de [U-^{14}C] 3-OMeG dans les cellules de réserve.

Cinétique du flux entrant

La cinétique du flux entrant dans la cellule de réserve montre que l'équilibre est atteint en une heure, lorsque la concentration extracellulaire de 3-OMeG est de 0,5 mM. La détermination de la Vmax (1,45 nM h^{-1} pour 2,5 10^6 cellules) et de la Km (0.13 mM) de la composante saturable de l'entrée de [U~14C] 3-OMeG dans les cellules de réserve a été déduite de la représentation de cette composante selon la méthode de Lineweaver et Burk (Figure 2).

Effet de la phlorétine

Comme le montre la Figure 3, l'entrée du 3-OMeG peut être presque totalement inhibée par la phlorétine, inhibiteur des transports facilités.

Immunofluorescence sur cellules vésiculeuses dissociées

Les lames témoins ne sont pas marquées. Les lames ayant reçu l'anticorps primaire présentent un marquage net d'une partie des cellules vésiculeuses (Tableau 1).

Immunofluorescence sur coupes de palpes

Aucun marquage n'a été détecté sur les lames témoins sans anticorps primaire. Les lames traitées avec l'anticorps, mettent en évidence un marquage au niveau des îlots de cellules vésiculeuses. Le marquage est absent du conjonctif qui entoure ces îlots (Tableau 1).

Le signal est localisé majoritairement au niveau de la membrane cellulaire et de façon moins significative, dans le cytoplasme.

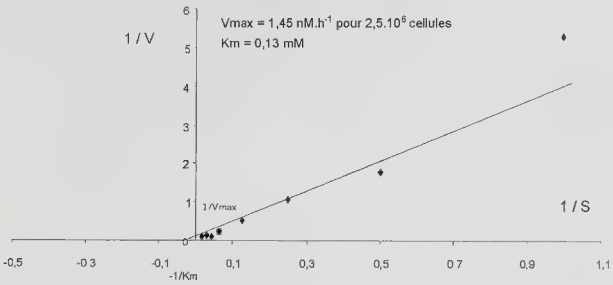


Figure 2. détermination de la Vmax et de la Km de la composante saturable de l' entrée de [U ^{14}C] 3 OMeG dans les cellules de réserve selon la méthode de Lineweaver et Burk.

V = vitesse d'entrée de 3-OMeG en nM h $^{-1}$ pour 2,5 millions de cellules.

S = concentration extracellulaire en 3-OMeG exprimée en nM

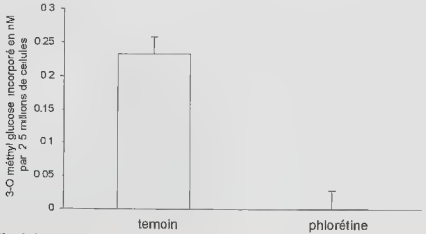


Figure 3 Effet de la phlorétine (0.3mM) sur l'entrée du 3-OMeG dans les cellules de réserve.

Tableau 1 Résultats des expériences d'immunofluorescence indirecte avec l'anticorps anti-GluT 4 (0: absence de marquage)

Type de préparation	Traitement post-fixation	Observations	Contrôle sans anticorps primaire
Cellules dissociées	sans triton	Présence de quelques cellules marquées mais marquage faible. Le signal est localisé hors du noyau, faible dans le cytoplasme, plus fort au niveau de la membrane	0
	avec triton	Le nombre de cellules marquées est plus important (environ 1/10) L'intensité du marquage est supérieure même localisation que sans triton	0
Cellules dissociées puis isolées sur gradient de percoll	avec triton	Le marquage est retrouvé	0
Coupes à congélation de palpes labiaux	avec triton	Net marquage par l'anticorps sous forme d'îlots de cellules marquées enveloppées de tissus conjonctifs non marqués Le marquage est plus intense au niveau membranaire mais un léger signal est également détecté dans le cytoplasme	0

DISCUSSION

Dans le but de comprendre les mécanismes de cette régulation chez *Crassostrea gigas*, une première étape a donc consisté à caractériser l'entrée du glucose dans la cellule de réserve grâce à un test biologique *in vitro* utilisant un analogue non métabolisable du glucose: le 3 O-méthyl glucose, marqué radioactivement au ^{14}C

Les résultats obtenus constituent une première approche de l'étude du transport du glucose dans les cellules de réserve chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. L'effet de la concentration extracellulaire de 3 OMeG sur le flux entrant de 3-OMeG montre qu'il existe deux composantes dans le transport du glucose dans la cellule de réserve, une composante de diffusion passive et une composante saturable avec la concentration en substrat. Lenoir (1989) avait également pu mettre en évidence chez la moule *Mytilus edulis* l'existence de ces deux modes de transport du glucose dans la cellule vésiculeuse.

La cinétique du flux entrant dans la cellule de réserve montre que l'équilibre est atteint en une heure, lorsque la concentration extracellulaire de 3 OMeG est de 0,5 mM. Chez *Mytilus edulis*, les résultats obtenus par Lenoir (1989) sont également de l'ordre de l'heure pour les cellules vésiculeuses.

Les valeurs faibles de la constante de Michaelis (Km=0.13mM) et de la vitesse maximale (Vmax=1 45 nmol par heure pour 2,5 millions de cellules) de la composante saturable d'entrée du glucose dans la cellule de réserve montrent la très grande affinité du 3-OMeG pour les systèmes de transport saturables. Ces valeurs sont inférieures à celles observées chez *Mytilus edulis* (Lenoir, 1989) où la Km est de 7,5 mM. Chez la moule, cette Km élevée, supérieure aux limites de la concentration en glucose circulant (estimé entre 0 et 1,5 mM), indique que le transport du glucose est loin de sa capacité maximale dans les conditions physiologiques, permettant ainsi une réponse

à toute augmentation éventuelle de la concentration en glucose circulant résultant. Chez l'huître creuse, la Km est plus faible, elle met en évidence un mécanisme d'entrée du glucose dans les cellules vésiculeuses qui atteindrait sa capacité maximale de transport pour de faibles valeurs de glucose circulant (ce qui doit être le cas lors de la mise en réserve hivernale).

L'inhibition totale du transport du 3 OMeG par la phlorétine, un inhibiteur non spécifique du transport facilité, à une concentration extracellulaire de 3 OMeG de 0,5 mM, montre qu'à des concentrations physiologiques de glucose, la diffusion intervient de façon négligeable dans le transport du glucose.

Chez de nombreux Invertébrés, on observe la présence simultanée du co-transport actif glucose sodium (Pajor *et al.*, 1989; Louzao *et al.*, 1993, Barnford et Gingles, 1974) et du transport facilité faisant intervenir les transporteurs de glucose (GluT) (Escher et Rasmuson Lestander, 1999, Skelly *et al.*, 1994; Rodriguez-Contreras *et al.* , 1998). La composante du transport facilité de glucose dans la cellule de réserve de *Crassostrea gigas* pourrait donc être la résultante de ces deux mécanismes de transport. La recherche de transporteurs de type GluT a été entreprise dans les cellules vésiculeuses d'huître en utilisant un anticorps anti-GluT4 de vertébrés en immunofluorescence indirecte. Toutes les expériences ont été menées sur des cellules ou des coupes provenant de palpes labiaux, seul tissu homogène composé essentiellement de tissu de réserve qui ne présente pas de variations saisonnières. Les résultats obtenus en immunofluorescence sur cellules dissociées de palpes ont permis de révéler la présence de molécules immunoréactives vis à vis de l'anticorps utilisé. En effet, le marquage s'avère négatif pour les lames témoins, alors qu'il se traduit par une fluorescence verte au niveau des régions cytoplasmiques et membranaires sur les lames testées avec anticorps. Le signal obtenu avec une dilution des anticorps au 10eme est dans tous les cas plus fort que celui obtenu avec des dilutions supérieures. Le traitement au triton accentue le marquage, avec un signal plus fort et un nombre de cellules marquées plus important. Ces premiers résultats ne suffisent cependant pas pour conclure à la présence de GluTs 4 au niveau des cellules vésiculeuses de *C. gigas*. En effet, la simple dissociation cellulaire conduit à l'obtention de suspensions contenant de multiples types cellulaires empêchant alors d'attribuer le marquage obtenu exclusivement aux cellules de reserve. Une étape de purification sur gradient de percoll a donc été entreprise. Les cellules ainsi purifiées présentent toujours un marquage du même type que celui décrit précedemment, révélant ainsi la présence de GluTs 4 au niveau des cellules de réserve. Les anticorps anti GluT4 couplés au fluorochrome ont également été testés sur des coupes congelées de palpes labiaux en section transversale. Les lames traitées avec l'anticorps montrent un marquage localisé dans les îlots de cellules, et absent du conjonctif qui les entoure. Cette localisation correspond parfaitement à l'aspect histologique du tissu de réserve (îlots entourés de conjonctif). Ces données sont donc tout à-fait compatibles avec la présence de protéine de type GluT au niveau des cellules vésiculeuses chez *Crassostrea gigas* La localisation de ces transporteurs à l'échelle cellulaire devra être précisée par des approches plus résolutives comme l'immunogold ou la microscopie confocale.

BIBLIOGRAPHIE

Barnford D R & Gingles R , 1974 Absorption of sugar in the gill of the japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology, part A*, **49**: 637-646.

Bayne B L , Bubel A., Gabbott P A , Livingstone D.R , Lowe D M & Moore M N , 1982. Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* (L.). *Marine Biological Letters* **3**. 89-105.

Berthelin C , Kellner K & Mathieu M , 2000a. Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells *Marine Biotechnology* **2**. 136 145.

Berthelin C., Kellner K. & Mathieu M., 2000b. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France) *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*, **125**. 359-369.

Coulon I , 1993 Mise au point d'un système contrôlé de culture de cellules de cœur d'huître *Crassostrea gigas*. Application au test de la toxicité des produits chimiques en milieu aquatique Thèse de Doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon.

Escher S A & Rasmuson Lestander A., 1999. The *Drosophila* glucose transporter gene: cDNA sequence, phylogenetic comparisons, analysis of functional sites and secondary structures *Hereditas* **130**: 95-103

Gabbott P A & Whittle M A , 1986. Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* (L.) -II. seasonal changes in the glycogen content and glycogen synthetase activity in the mantle tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*, **83**(1): 197-207

Heude-Berthelin C., 2000. Etude du métabolisme du glycogène chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* Impact sur la reproduction et les mortalités estivales. Thèse de Doctorat, Université de Caen.

Lenoir F , 1989. Mise au point de techniques de dissociation, de purification et de culture cellulaires chez la moule *Mytilus edulis* (L.). Application à l'étude des régulations du métabolisme du glycogène dans les cellules à glycogène (= cellules vésiculeuses). Thèse de Doctorat, Université de Caen.

Louzao M C , Vieytes M R. & Botana L.M , 1993 D glucose transporter on mussel mantle cell membranes: effect of sodium and phlorizin. *Journal of Experimental Zoology* **267**. 572-577

Mathieu M. & Lubet P , 1993 Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves a brief review. *Invertebrate Reproduction and Development* **23**(2-3): 123-129.

Mosman T , 1983 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. application to proliferation and toxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**: 55-63

Pajor A.M , Moon D A & Whright S.H , 1989 Sodium D-glucose cotransport in the gill of the marine mussels: studies with intact tissue and brush-border membrane vesicles *Journal of Membrane Biology* **107**: 77-88

Robert R., Trut G., Borel M. & Mauret D., 1993 Growth, fatness and gross biochemical composition of the japanese oyster, *Crassostrea gigas*, in Stanway cylinders in the Bay of Arcachon, France *Aquaculture* **110**. 249-261.

Rodriguez-Contreras D., Skelly P J , Landa A. & Dniedzic W R., 1998 Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologs (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. *Parasitology* **117**: 579-588

Ruiz C , Martinez D., Mosquera G., Abad M & Sanchez J L , 1992. Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibran (Galicia, Spain). *Marine Biology* **112**. 67-74.

Scherrer B., 1984. Biostatistiques. Gaëtan Morin, Montréal. 850 pp

Skelly P.J , Kim J.W., Cunningham J & Shoemaker C B , 1994 Cloning, characterization, and functional expression of cDNAs encoding glucose transporter proteins from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 4247-4253.

Walne P.R & Mann R , 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* In Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium: 587-607.

Wright S H., Pajor A.M., Moon D A. & Wunz T M , 1992. High affinity phlorizin binding in *Mytilus* gill *Biochimica et Biophysica Acta* **1103**. 212-218.

Zaba B N & Davies J I , 1984. Glycogen metabolism and glucose utilisation in the mantle tissue of *Mytilus edulis*. *Molecular Physiology* **5**: 261-283

Zaba B N , Gabbott P A. & Davies J.I., 1981 Seasonal changes in the utilisation of ^{14}C- and ^{3}H labelled glucose in the mantle tissue slice preparation of *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*, **70**. 689-695

Appariement et reproduction chez un hermaphrodite simultané, la planorbe *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastéropode, Pulmoné)

Marc VIANEY-LIAUD [1]

ABSTRACT

Pairing and reproduction in a simultaneous hermaphrodite, the planorbid *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonate Gastropod)

In isolated hermaphrodite freshwater snails Biomphalaria glabrata reproducing exclusively by self-fertilization (1), fecundity is statistically constant. Pairing during 24 hours (2) or even a single copulation (3) significantly enhance the numbers of eggs, of eggs per egg-mass and the hatchability. The copulation, as a female, with a previously castrated partner (4) has similar effects. If copulation is prevented in paired snails sharing the same water (5), the fecundity and the frequency of oviposition increase.

The cross-fertilization due to the use of the allosperm (2 and 3) cannot explain alone that fecundity increases. The same effects appear in paired partners, even if they reproduce by self-fertilization (4 and 5). The fecundity can be also influenced by chemical and behavioural factors.

RÉSUMÉ

Chez des planorbes *Biomphalaria glabrata* isolées qui se reproduisent par autofécondation (1), la fécondité est constante. L'appariement avec une partenaire durant 24 heures (2) ou même un accouplement unique (3), provoquent une augmentation significative du nombre d'œufs produits, du nombre d'œufs par ponte et du taux d'éclosion. L'accouplement, en tant que femelle, avec une partenaire préalablement castrée (4), entraîne des effets comparables. La coexistence de deux individus, partageant la même eau mais empêchés de s'accoupler (5), augmente significativement les trois variables mesurées ainsi que la fréquence de l'oviposition.

En fécondation croisée, l'utilisation de l'allosperme (2 et 3) n'explique pas, à elle seule, l'augmentation de la fécondité, celle ci s'observe aussi chez des planorbes mises en présence de partenaires mais ne pratiquant que l'autofécondation (4 et 5).

Des facteurs actuellement non identifiés, par exemple chimiques ou comportementaux, peuvent expliquer les phénomènes observés.

[1] Laboratoire Génétique et Environnement, Institut des Sciences de l'Environnement, UMR 5554, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier cedex 05 (France). e mail: <vianey@isem.univ-montp2.fr>

INTRODUCTION

Chez *Biomphalaria glabrata*, il existe une courte période protandre fonctionnelle qui précède l'établissement ultérieur d'un hermaphrodisme simultané (Trigwell et Dussart, 1998). Les individus isolés se reproduisent par autofécondation tandis que les individus groupés se reproduisent préférentiellement par fécondation croisée (Brumpt, 1941; Paraense, 1955; Vianey-Liaud *et al.*, 1987, 1989, 1991; Vernon *et al.*, 1995, Vianey-Liaud, 1997). Dans la plupart des cas, la copulation implique deux individus, l'un fonctionnant comme mâle, l'autre comme femelle (Brumpt, 1941; Trigwell *et al.*, 1996; Vernon et Taylor, 1996, Vianey-Liaud, 1997).

Lorsqu'une planorbe sexuellement mûre et vierge reçoit l'allosperme d'une partenaire, elle passe immédiatement de l'autofécondation à l'allofécondation. Cet allosperme est dans un premier temps le seul utilisé puis, progressivement, des descendants issus des deux modes de fécondation coexistent dans les mêmes pontes jusqu'à épuisement de l'allosperme reçu (Vianey-Liaud *et al.*, 1987, 1989, 1991; Vianey-Liaud, 1995, 1997). Le retour progressif vers l'autofécondation est marqué par une diminution significative des nombres de pontes, d'œufs et d'œufs par ponte (Vianey-Liaud, 1976).

On pouvait donc s'attendre à ce que, suite à un appariement entre deux individus, le passage de l'autofécondation vers l'allofécondation soit suivi d'un accroissement de la fécondité. Les résultats expérimentaux présentés ici sont destinés à confirmer cette hypothèse et à rechercher quels sont les facteurs impliqués dans cette augmentation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les animaux utilisés étaient des *B. glabrata* sexuellement mûres et vierges, se reproduisant donc exclusivement par autofécondation. Quatre variables ont été prises en compte: nombre de pontes, nombre total d'œufs, nombre d'œufs développés, taux d'éclosion.

Pour chaque groupe expérimental, ces variables ont été comparées, chez les mêmes individus, au cours de deux périodes successives de 10 jours. Au cours des 10 premiers jours, toutes les planorbes restent isolées. Au cours des 10 jours suivants:

- groupe 1: tous les individus restent isolés (= témoins)
- groupe 2: appariement de 24 h. suivi du ré-isolement des planorbes
- groupe 3: la durée de l'appariement est limitée à un seul accouplement
- groupe 4: l'appariement de 24 h. implique un individu normal et une partenaire préalablement castrée

groupe 5: les paires sont formées de deux individus partageant la même eau, sans possibilité de contacts interindividuels.

RÉSULTATS

Chez les témoins (groupe 1), les 4 variables sont constantes au cours du temps.

Un appariement de 24 h. suivi du ré-isolement des partenaires (groupe 2) entraîne une augmentation significative du nombre total d'œufs, d'œufs développés et du taux d'éclosion.

Si le rapprochement des individus est limité à un seul accouplement (groupe 3), seul le taux d'éclosion augmente significativement.

L'accouplement avec une partenaire castrée entraîne (groupe 4), chez l'individu normal, une augmentation significative du nombre total d'œufs, du nombre d'œufs développés et du taux d'éclosion. Le dépôt par la planorbe castrée de pontes contenant des œufs stériles reste très faible

La réunion de deux individus dans la même eau (groupe 5), sans possibilité ni d'accouplement ni même de contacts, entraîne néanmoins une augmentation significative des quatre variables.

DISCUSSION

La fécondité, exprimée par les quatre variables, demeure constante pendant la durée de l'expérience lorsque l'autofécondation est le seul mode de reproduction possible (animaux témoins isolés, groupe 1). Cela confirme des résultats antérieurs (Vianey-Liaud, 1976).

On peut être tenté d'expliquer les effets de l'appariement de 24 h. (groupe 2) par l'utilisation immédiate et quasi exclusive (Vianey Liaud, 1995) de l'allosperme échangé entre les deux partenaires. Un transfert de sperme limité à un seul accouplement (groupe 3) pourrait corroborer cette interprétation.

Lors des appariements individu normal/castré (groupe 4), il n'y a pas de transfert de sperme de la planorbe castrée vers la planorbe normale et l'autofécondation reste le mode exclusif de reproduction de la planorbe normale. Les résultats sont cependant identiques à ceux obtenus après les appariements de 24 h. entre individus normaux.

Dans le cas des individus partageant la même eau (groupe 5), la fécondité, y compris le nombre de pontes, augmente de façon significative, alors que l'autofécondation reste le seul mode de reproduction des deux partenaires.

Les animaux des groupes 1, 4 et 5 se reproduisent exclusivement par autofécondation. Cependant, si la fécondité demeure, au cours du temps, constante chez les témoins toujours isolés (groupe 1), elle augmente après la constitution des paires (groupes 4 et 5) et les résultats sont finalement comparables à ceux observés lors du passage de l'autofécondation vers l'allofécondation. La pénétration de la partenaire non suivie d'échanges génétiques (groupe 4) ne peut expliquer cette contradiction. La qualité de l'eau partagée, des contacts visuels, etc... pourraient être impliqués.

Cela incite à beaucoup de prudence lors de la comparaison des effets des deux modes de reproduction. Une vision "tout génétique" où tout serait la conséquence du génotype des gamètes participant à la fécondation et des descendants ne peut pas être retenue, au moins chez l'espèce étudiée, *B. glabrata*. Les variations de la fécondité observées répondent certainement à une régulation beaucoup plus complexe.

BIBLIOGRAPHIE

Brumpt E., 1941. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis* (*Australorbis*) *glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. *Annales de Parasitologie* **18**: 9-45

Paraense WL (1955) Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **53**: 285-291

Trigwell J & Dussart G., 1998 Functional protandry in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda Pulmonata), an intermediate host of *Schistosoma*. *Journal of Molluscan Studies* **64**: 285-288

Trigwell J., Dussart G & Vianey Liaud M., 1996 Mating strategies in the freshwater hermaphrodite snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastropoda: Pulmonata). *Haliotis* **26**: 25-32

Vernon J. & Taylor J., 1996 Patterns of sexual roles adopted by the schistosome-vector snail *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies* **62**: 235-241

Vernon J., Jones C & Noble L., 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal cross-fertilisation in *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata Basommatophora) *Journal of Molluscan Studies* **61**: 455-465

Vianey-Liaud M., 1976 Influence de l'isolement et de la taille sur la fécondité du planorbe *Australorbis glabratus* (Gastéropode Pulmoné). *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique* **110**: 5-29

Vianey Liaud M., 1995 Bias in the production of heterozygous pigmented embryos from successively mated *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda Planorbidae) albino snails *Malacological Review* **28**: 97-106

Vianey Liaud M., 1997. La reproduction chez un Mollusque hermaphrodite simultané, la planorbe *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastéropode, Pulmoné). *Haliotis* **27**: 67-114

Vianey-Liaud M., Dupouy J., Lancastre F. & Nassi H., 1987. Genetical exchanges between one *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda Planorbidae) and a varying number of partners. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **82**: 457-460

Vianey-Liaud M., Nassi H., Lancastre F. & Dupouy J., 1989. Duration of pairing and use of allosperm in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda Planorbidae) *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **84**: 41-45

Vianey-Liaud M., Dupouy J., Lancastre F & Nassi H., 1991 Constant use of allosperm by female-acting snails after successive cross-fertilizations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda Planorbidae) *Malacological Review* **24**: 73-78

Effets molluscicides de saponines extraites des graines de tomate

Marc VIANEY-LIAUD [1] et Yves BAISSAC [2]

ABSTRACT

Molluscicidal effects of saponins extracted from tomato

The molluscicidal properties of saponins extracted from tomato fruits were investigated Steroidal, furostanic saponins were extracted from tomato seeds. In addition, enzymatic hydrolysis was used to obtain steroidal spirostanic saponins. The molluscicidal effects of these two families of molecules were investigated in the laboratory by testing with a neotropical planorbid snail, *Biomphalaria glabrata* At the concentrations investigated (maximum 100 µg.ml^{-1}), the furostanic saponins did not cause mortality The molluscicidal effect of the spirostanic saponins depended on dose and duration of exposure Survivorship at the end of the treatment could temporarily mask an eventual lethal outcome When the snail's food comprised tomato fragments, the survival, growth and fecundity of *B. glabrata* were strongly affected

RÉSUMÉ

Des saponines stéroïdiques furosatniques ont été extraites de graines de tomate A partir de celles ci, une hydrolyse enzymatique a permis d'obtenir des saponines stéroïdiques spirostaniques D'éventuels effets molluscicides de ces deux familles de molécules ont été recherchés au laboratoire, sur la planorbe néotropicale *Biomphalaria glabrata*

Aux doses testées, jusqu'à 100 µg.ml^{-1}, les saponines furostaniques n'ont entraîné aucune mortalité Les effets létaux des saponines spirostaniques dépendent de la dose utilisée et de la durée du traitement. Cependant, la survie en fin de traitement peut masquer temporairement un effet létal qui surviendra ultérieurement.

Quand la nourriture des planorbes est constituée par des fragments de tomate, leur survie, leur croissance et leur fécondité sont fortement réduites.

[1] Laboratoire de Génétique et Environnement, Institut des Sciences de l'Evolution, UMR 5554, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier (France)

[2] Laboratoire de Recherches sur les Substances Naturelles Végétales, UPRESA 1677, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier (France).

INTRODUCTION

Les saponines furent historiquement mises en évidence par leurs propriétés tensioactives: par agitation dans l'eau, elles forment des mousses stables, tout comme les savons, d'où leur nom générique. Elles sont présentes dans quelques groupes animaux (spongiaires, cnidaires, échinodermes, poissons). Néanmoins, elles sont plutôt caractéristiques des angiospermes monocotylédones et dicotylédones, où elles sont fréquemment présentes. A titre d'exemple, sur 1730 espèces de plantes d'Asie centrale étudiées, 70% d'entre-elles renferment des saponines (Gubanov *et al.*, 1970).

Les saponines (= saponosides) sont des glucosides de poids moléculaire souvent supérieur à 1000. Toutes les saponines sont composées de deux parties qui peuvent être séparées par hydrolyse enzymatique:

- aglycone, qui ne contient pas de sucre
- oses: pentose(s), hexose(s) et/ou acide(s) uronique(s).

Les trois grandes classes de saponines sont différenciées selon la structure de la partie non osidique de la molécule (Hostettman et Marston, 1995):

- saponines triterpénoïdiques
- saponines stéroïdiques alcaloïdiques = basiques
- saponines stéroïdiques, furostaniques et spirostaniques.

Les saponines ont de nombreuses propriétés, physico-chimiques, pharmacologiques et biologiques (Vogel, 1963; Pinkas *et al.*, 1972; Lacaille-Dubois et Wagner, 1996). Parmi ces dernières, il a été démontré l'existence d'activités antivirales, antifongiques, antibactériennes, antiplasmodiques, antileishmaniennes, antihelminthiques, insecticides, piscicides et molluscicides (Khoda *et al.*, 1989).

Chez les solanacées, de nombreuses espèces renferment des saponines alcaloïdiques, plus rarement des saponines stéroïdiques furostaniques. Chez la tomate *Lycopersicum esculentum*, il existe des saponines alcaloïdiques dans les feuilles, les racines et les graines. Dans les graines, Sato et Sakamura (1973), démontrent aussi l'existence d'une saponine stéroïdique furostanique au goût amer : TF1. Environ 6,5 % du poids des graines correspond aux saponines stéroïdiques furostaniques et alcaloïdiques (Figure 1).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'extraction de ces saponines, à partir des résidus (= drèches) de l'industrie de transformation de la tomate a été réalisée selon la méthode suivante:

Les graines ne contiennent pas naturellement de saponines stéroïdiques spirostaniques.

Par hydrolyse enzymatique des saponines stéroïdiques furostaniques pures (ß-glucosidase), extraction au N-butanol et séparation par HPLC, il est possible d'obtenir des saponines stéroïdiques spirostaniques.

Tableau 1. Extraction des saponines de la graine de tomate

- flottaison: ⇨ «peaux»

⇨ graines

- séchage, broyage, tamisage
- extraction:
- hexane ⇨ lipides
- éthanol 70% ⇨ «tourteaux»

⇨ extrait brut de saponines

- ultrafiltration ⇨ saponines alcaloïdiques
- lavage N-butanol ⇨ saponines alcaloïdiques
- lavage H_2O, lyophilisation
- chloroforme ⇨ lipides, pigments
- purification HPLC ⇨ pigments

⇨ saponines stéroïdiques furostaniques pures

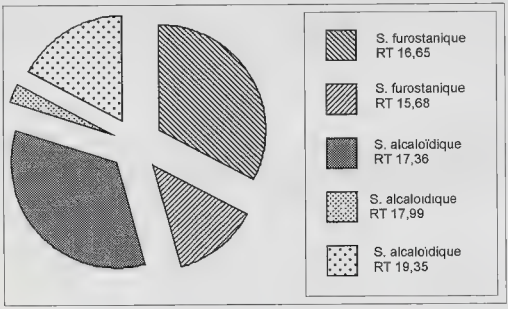


Figure 1. Saponines présentes dans les graines de tomate. RT = temps de rétention

L'activité molluscicide des saponines stéroïdiques furostaniques et spirostaniques a été testée sur des planorbes américaines *Biomphalaria glabrata*, de souche albinos.

La méthode utilisée suit les recommandations de l'O.M.S. (OMS, 1965). Les tests ont été effectués sur de jeunes adultes (diamètre compris entre 9,5 et 11 mm) placés dans des récipients contenant 300 ml d'eau, à raison de 10 mollusques par bac. La substance testée, solubilisée dans de l'eau pure ou du DMSO, est ajoutée à l'eau déionisée pour obtenir les concentrations finales souhaitées, de 10^{-1} µg.ml^{-1} à 100 µg.ml^{-1}. Des groupes témoins sont constitués, avec des mollusques placés dans de l'eau pure ou du DMSO aux concentrations égales à celles des tests.

Les animaux sont mis au contact des solutions pendant 6 ou 24 heures puis rincés à l'eau pure où ils sont conservés 48 heures. Au terme du traitement, puis après 24 et 48 heures, il est déterminé le nombre d'animaux morts (immobilité, rétraction dans la coquille, non réactivité à la piqûre, absence de battements cardiaques).

RÉSULTATS

Eau pure ou DMSO seul

Dans l'ensemble des groupes témoins, aucune mortalité n'a été observée.

Saponines stéroïdiques furostaniques

Aux différentes concentrations, jusqu'à 100µg.ml^{-1}, aucune mortalité n'est observée après 24 heures de traitement ainsi que 48 heures après le traitement.

Saponines stéroïdiques spirostaniques, traitement: 6 heures

Les concentrations variant de 10^{-1} µg à 10 µg.ml^{-1} produisent peu d'effets: mortalité nulle après le traitement, très limitée après récupération. Pour des concentrations plus élevées (33 et 66 µg.ml^{-1}), même si les animaux vivent après le traitement, une proportion importante ou la quasi totalité d'entre eux ne survivent pas après celui-ci. C'est encore plus net pour une concentration de 100 µg.ml^{-1}: seuls 10% des individus sont tués lors du traitement mais tous sont morts 48 heures plus tard (Tableau 2).

Tableau 2 Effets de la concentration des saponines spirostaniques sur la survie de *Biomphalaria glabrata* Traitement: 6 heures.

En présence de saponines stéroïdiques spirostaniques	Récupération en eau pure		
Concentration	Mortalité %		
	6 heures	24 heures	48 heures
10^{-1} µg . ml^{-1}	0	0	0
1 µg . ml^{-1}	0	0	0
10 µg . ml^{-1}	0	0	7
33 µg . ml^{-1}	0	33	43
66 µg . ml^{-1}	0	87	96
100 µg . ml^{-1}	10	83	100

Saponines stéroïdiques spirostaniques, traitement: 24 heures

Pour une concentration de 1 µg.ml $^{-1}$, la mortalité est négligeable, même après 48 heures de récupération. Au contraire, pour 10 µg.ml $^{-1}$, 20% des planorbes sont tuées par le traitement et les survivantes meurent toutes au cours de la récupération (Tableau 3).

Tableau 3 Effets de la concentration des saponines spirostaniques sur la survie de *Bomphalaria glabrata*. Traitement: 24 heures.

En présence de saponines stéroïdiques spirostaniques	Récupération en eau pure	
Concentration	Mortalité %	
	24 heures	24 heures	48 heures
1 µg ml^{-1}	0	3	3
10 µg . ml^{-1}	20	100	100

DISCUSSION

Ces résultats montrent les effets molluscicides de certaines saponines, ici les saponines stéroïdiques spirostaniques sur l'espèce étudiée, *B. glabrata*.

Comme on pouvait s'y attendre, les effets sur la survie des mollusques dépendent de la dose utilisée et de la durée d'exposition.

La survie ne peut cependant pas être uniquement prise en compte à l'issue du traitement. Il apparaît clairement qu'un effet létal peut apparaître après la fin du traitement, pendant la période de récupération. Il est vraisemblable que la réduction de la mobilité des planorbes en est la cause. En effet, les planorbes sont des gastéropodes pulmonés qui, bien qu'aquatiques, ont une respiration aérienne. La respiration nécessite que les animaux atteignent l'interface eau/air pour y ouvrir leur pneumostome. Tout processus qui empêche les planorbes d'atteindre périodiquement la surface de l'eau, par exemple une limitation de leur mobilité, cause rapidement leur mort. Il est de fait fréquent de voir des animaux vivants en fin de traitement mais à mobilité réduite ou absente.

B. glabrata est une des planorbes vecteur du trématode *Schistosoma mansoni*, parasite responsable de la bilharziose intestinale humaine. La lutte antibilharzienne a retenu l'attention des communautés scientifiques et médicales depuis plusieurs dizaines d'années. Toute technique visant à éliminer les mollusques, avec si possible un minimum de conséquences sur les écosystèmes dulçaquicoles, peut y contribuer. La lutte chimique, particulièrement en utilisant des extraits végétaux, est l'une d'elle (Martson et Hostettman, 1985; Yadav et Singh, 2001).

Les résultats préliminaires rapportés ici, s'ils confirment bien les effets molluscicides de certaines saponines, ont été obtenus au laboratoire. Leur extrapolation aux milieux naturels est purement spéculative. Outre les problèmes techniques, se poserait le problème du coût. Même sur des points d'eau réduits, le volume à traiter ne serait plus de l'ordre du ml mais au minimum du m^3 et sans doute beaucoup plus. Il faut aussi remarquer que les saponines à effets molluscicide (spirostaniques) ne sont pas naturellement présentes, sinon à titre transitoire, dans la tomate et

qu'elles ne sont obtenues qu'après hydrolyse enzymatique des saponines furostaniques. A supposer que les DL 100 soient identiques au laboratoire et dans la nature, une estimation grossière montre que la seule extraction des saponines coûterait au minimum 75 euros pour éradiquer les planorbes dans 1 m³ d'eau. Un tel coût est prohibitif, sans doute à long terme, même si les techniques d'extraction peuvent être améliorées en vue d'en abaisser le coût.

PERSPECTIVES

Cela nous amène à envisager de prendre le problème, l'élimination des planorbes, «par l'autre bout». Faute de pouvoir efficacement agir à partir d'extraits purs de saponines, on peut envisager aussi de possibles effets, pour un moindre coût, de fruits entiers puis de fractions de plus en plus fines.

Des expériences préliminaires montrent que substituer des tranches de tomate à la laitue (nourriture généralement utilisée dans de nombreux laboratoires) n'est pas sans conséquence. La survie des planorbes est plus faible et leur croissance pondérale réduite mais c'est la reproduction des *B. glabrata* qui est la plus affectée.

La comparaison laitue *vs* tomate montre un effet significatif sur l'oviposition: 182 pontes *vs* 12 pontes, le nombre total d'œufs: 2707 *vs* 240 et leur taux d'éclosion: 92,4% *vs* 9,6%. Au total, à partir de deux lots de 35 planorbes nourries soit avec de la laitue et soit avec de la tomate, on obtient respectivement 16 jours plus tard: 2503 et 23 descendants. Les études se poursuivent pour tenter de comprendre les raisons de ces différences et de déterminer les composants de la tomate qui en sont responsables.

BIBLIOGRAPHIE

Gubanov I., Lubizov N. & Gladkikh A., 1970 Search for saponine-containing plants among the flora of Central Asia and Southern Kazakhstan. *Farmatsya* **19**: 23-31.

Khoda H., Takeda O. & Tanaka S., 1989. Molluscicidal triterpenoidal saponin from *Lysimachia sikokiana* *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **37**: 3304-3305

Hostettman K. & Marston A., 1995. Saponins. Cambridge University Press. 548 p.

Lacaille-Dubois M. & Wagner H., 1996 A review of biological and pharmacological activities of saponins *Phytomedicine* **2**: 363-386.

Martson A. & Hostettman K., 1985. Plant molluscicides. *Phytochemistry* **24**. 639-652.

O M S, 1965 Molluscicide screening and evaluation *Bulletin of World Health Organization* **33**: 567 581

Pinkas M., Trotin F. & Bezanger Beauquesne L., 1972 Les saponosides *Produits et problèmes pharmaceutiques* **27**:187-198.

Sato H. & Sakamura S., 1973. A bitter principle of tomato seeds Isolation and structure of a new furostanol saponin. *Agricultural Biological Chemistry* **37**: 225-231

Vogel G., 1963. Zur Pharmakologie von Saponinen. *Planta Medica* **11**: 362-376.

Yadav P. & Singh A., 2001 Environmentally safe molluscicides from two common euphorbiales *Iberus* **19** 65-73

Utilisation de la réponse de quatre biomarqueurs d'exposition chez les bivalves *Perna perna* et *Donax trunculus* pour l'évaluation de la pollution dans la baie d'Agadir (Sud du Maroc)

*Fatima EL HAMIDI[1], Ali BANAOUI[1], Mohamed AZDI[1], Abderrazak KAAYA[1], Abderrahmane ZEKHNINI et Abdellatif MOUKRIM[1]**

SUMMARY

Use of four biomarkers of exposition response on bivalves *Perna perna* and *Donax trunculus* for the evaluation of pollution in Agadir Bay (Southern Morocco)

The health state of Agadir marine bay was evaluated by studying response of four biomarkers in two mollusc species (*Perna perna* and *Donax trunculus*, respectively characterizing the rocky substrates and the sandy beaches) exposed to the sediment sampled in various sites of the bay. The biomarkers considered were: Acétylcholinestérase (AChE), Catalase (CAT), Glutathion S-transférase (GST) and Malondialdéhyde (MDA). The results obtained showed that the response of these biochemical indicators varies according to the species and to the origin of the sediment. Thus, a significantly increased GST activity was recorded in molluscs exposed to the Anza sediment (38.2 ± 6.1 and 109.5 + 35.7 nmol/mn/mgP in exposed animals compared to 17.4 ± 4.4 and 70.5 + 19.4 nmol/mn/mgP in non-exposed animals, respectively for *P. perna* and *D. trunculus*). The MDA rates and CAT activity showed a comparable profiles at the two species, with a significant induction for Anza and Port sites in *P. perna* and for Anza, Port and Oued Souss estuary in *D. trunculus*. This could be related to the effects of contaminants coming from domestic and industrial wastewater and Port activity. For the sediment of Oued Souss estuary, animals showed more marked inhibition of AChE compared to the other sites. This inhibition could be related to the agricultural activities (use of pesticides) installed along the Oued Souss. In addition, the death rate was followed during the exposure, and only the sediment of the Port site showed a strong mortality of the animals.

[1] Laboratoire Eau et Environnement, Université Ibn Zohr, Faculté des Sciences, BP 28/S, 80000, Agadir, Maroc. Fax: + 212.48.220100. * Auteur recevant la correspondance, e-mail: <mouknm@nomade.fr>

RÉSUMÉ

L'état de santé de la baie d'Agadir a été évalué à travers la réponse de quatre biomarqueurs chez deux espèces de mollusques (*Perna perna* et *Donax trunculus*, caractérisant respectivement les substrats rocheux et les plages sableuses), exposés à des échantillons de sédiment provenant de différents sites de la baie. Les biomarqueurs considérés sont Acétylcholinestérase (AChE), Catalase (CAT), Glutathion S transférase (GST) et Malondialdéhyde (MDA).

Les résultats obtenus montrent que la réponse de ces indicateurs biochimiques varie en fonction de l'espèce et de l'origine du sédiment. Ainsi, une hausse significative de l'activité GST a été enregistrée chez les mollusques exposés au sédiment d'Anza (38,2 ± 6,1 et 109,5 ± 35,7 nmol/mn/mgP chez les exposés contre 17,4 ± 4,4 et 70,5 ± 19,4 nmol/mn/mgP chez les non exposés, respectivement pour *P. perna* et *D. trunculus*). Le taux de MDA et l'activité CAT montrent un profile comparable chez les deux espèces, avec une induction significative pour les sites Anza et Port chez *P. perna*, et pour Anza, Port et Estuaire de l'Oued Souss chez *D. trunculus*. Ce résultat serait lié aux effets de contaminants en provenance des eaux usées et de l'activité portuaire. Pour le sédiment de l'estuaire de l'Oued Souss, les animaux ont montré une inhibition plus marquée de l'AChE par rapport aux autres sites. Cette inhibition serait liée aux activités agricoles (utilisation de pesticides) le long de l'oued Souss. Le taux de mortalité a été également suivi durant l'exposition. Seul le site du Port a montré une forte mortalité des animaux.

INTRODUCTION

Les biomarqueurs (indicateurs biochimiques ou physiologiques d'exposition des organismes aux xénobiotiques) constituent actuellement des outils très utiles et complémentaires aux analyses chimiques, dans le sens qu'ils apportent des renseignements sur l'impact des contaminants sur le milieu. Ces paramètres sont de plus en plus utilisés dans les programmes internationaux pour la surveillance de la qualité des écosystèmes aquatiques (Narbonne *et al.*, 1991). Ils ont été proposés, par plusieurs auteurs, comme outil d'évaluation de la pollution dans le milieu marin (Viarengo *et al.*, 1990; Narbonne *et al.*, 1991; Burgeot *et al.*, 1996; Labrot *et al.*, 1996). En outre, ils présentent un intérêt particulier pour les pays en voie de développement en raison de la simplicité de leur mise en place et leur coût peu onéreux.

Depuis quelques années, notre laboratoire a développé des études visant l'utilisation de certains biomarqueurs pour l'évaluation de l'état de salubrité des côtes marocaines. Pour ce faire, plusieurs travaux ont été entrepris pour mettre au point le dosage et la validation de ces biomarqueurs de contamination chez les mollusques *P. perna*, *M. galloprovincialis* et *D. trunculus*. La validation de ces techniques est réalisée grâce au suivi annuel et à la comparaison de ces biomarqueurs dans deux sites de la baie: un site de référence et un site pollué (El Hamidi, 1995; Lagbouri, 1997; Kaaya *et al.*, 1999; Najimi, 1999; Kaaya, 2002).

L'objectif du présent travail est d'utiliser ces techniques pour l'identification des éventuelles sources de pollution dans la baie d'Agadir et l'évaluation de l'impact de cette pollution sur les êtres vivants. Ainsi, nous avons exposé deux mollusques (*Perna perna* vivant sur les rivages rocheux et *Donax trunculus* vivant dans les plages sableuses) à des sédiments prélevés dans différents sites de la baie, et suivi la réponse des biomarqueurs chez ces mollusques. Quatre biomarquers ont été retenus dans le cadre de cette étude: l'acétylcholinesterase en tant que marqueur de neurotoxicité inhibé par les pesticides organophosphorés et carbamates ou encore par les métaux lourds (Bocquéné *et al.*, 1990), la Catalase et le Malondialdéhyde en tant que marqueurs de stress oxydant induits par les polluants métalliques et organiques (Solé *et al.*, 1995; Cheung *et al.*, 2001) et la Glutathion S-transférase (GST) en tant qu'enzyme de biotransformation induite par les polluants organiques (van der Oost, 1996).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Prélèvement du sédiment

Les prélèvements des échantillons de sédiments ont été effectués au niveau de cinq sites représentatifs de la baie d'Agadir (Figure 1): i) Cap Ghir (CG), site situé à 50 km au Nord de la ville d'Agadir et loin de toute source de pollution; nous considérons ce site comme "site de référence", ii) site d'Anza (AN) situé à 10 Km au nord d'Agadir et recevant les eaux usées domestiques et industrielles de la ville d'Anza, iii) Port d'Agadir (PR) qui présente une forte activité surtout en période de repos biologique (4 mois/an) où des centaines de bateaux restent au port, iv) Plage municipale d'Agadir (PL) qui constitue l'une des plages les plus fréquentées de la baie et v) l'embouchure de l'Oued Souss (OS) qui correspond à un estuaire faisant partie d'une réserve naturelle en raison du nombre d'espèces d'oiseaux qui y passent. Toutefois ce site connaît des problèmes de pollution car il reçoit les rejets des eaux usées des villes avoisinantes (Figure 1). Rappelons aussi, que l'oued traverse une large zone agricole.

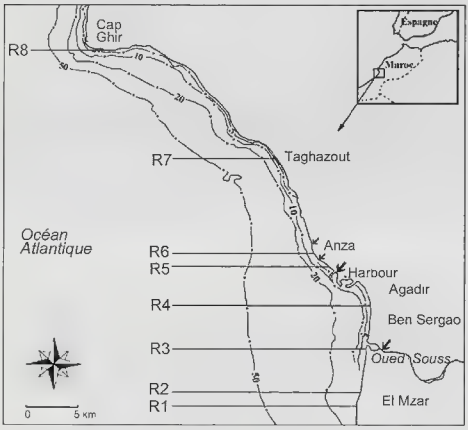


Figure 1. Localisation géographique des sites (➔ Rejets d'eaux usées, R Radiale)

Le sédiment est prélevé à la surface puis transporté dans des conditions isothermes jusqu'au laboratoire, où il est mélangé et agité, pendant 24 h, avec de l'eau de mer du site de référence. Environ 500 g de sédiment par 5 litres d'eau dans les bacs à exposition sont utilisés.

Prélèvement et exposition des animaux

Des échantillons d'animaux d'une taille homogène, 40 mm pour *Perna perna* et 20 mm pour *Donax trunculus*, ont été prélevés dans le site du Cap Ghir puis transportés dans de l'eau de mer jusqu'au laboratoire où ils sont mis en stabulation à 18°C pendant 48 heures.

Un lot d'animaux a été utilisé pour l'analyse des biomarqueurs avant exposition et le reste est transféré dans des bacs en plastiques contenant chacun le sédiment correspondant mélangé à l'eau de mer. L'exposition a eu lieu à 18°C et à une photopériode 12H/12H pendant une durée de 15 jours après laquelle le taux de mortalité est relevé et les biomarqueurs sont analysés.

Analyses biochimiques

Les quatre biomarqueurs étudiés ont été mesurés sur la fraction post mitochondriale (S9), obtenue après broyage de la masse molle des animaux dans du tampon Tris 100 mM; pH 7,4 et centrifugation à 9000 g pendant une demi-heure à 4°C.

Les analyses des biomarqueurs ont été effectuées par des méthodes colorimétriques: la méthode d'Ellman *et al.* (1961) pour l'AChE, la méthode d'Habig *et al.* (1974), la méthode d'Aebi (1985) pour la CAT et la méthode de Sunderman *et al.* (1985) pour le MDA.

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Lowry *et al.* (1951).

Expression des résultats

Le taux de mortalité des animaux exposés est exprimé en pourcentage.

Les activités AChE et GST sont exprimés en nanomoles/minute/milligramme de protéines du S9, la CAT en micromoles/minute/milligramme de protéines du S9 et le taux de MDA en nanomoles/milligramme de protéines du S9.

Les résultats, exprimés en moyenne affectée par l'erreur standard (m ± SEM), sont calculés à partir des 6 à 8 répétitions effectuées (n = 6 à 8). La comparaison des moyennes est effectuée par l'analyse de variance (ANOVA) et par le test de la plus petite différence significative (LSD) en utilisant le logiciel STATISTICA (Version 5.1H, Edition StatSoft, 1997).

RÉSULTATS

La figure 2 représente la mortalité des animaux exposés au sédiment de différents sites de la baie d'Agadir. A l'exception du sédiment du Port qui induit un taux de mortalité dépassant les 50%, les valeurs obtenues pour les autres sites sont faibles (< 20%).

Concernant les biomarqueurs, les figures 3, 4, 5 et 6 résument respectivement les réponses de l'AChE, de la GST, de la CAT et du taux de MDA chez *Perna perna* et *Donax trunculus* exposés pendant 15 jours aux sédiments des différents sites. Les résultats montrent que la réponse de ces biomarqueurs varie en fonction de l'espèce et de l'origine du sédiment d'exposition.

Dans le cas de l'AChE, on note une inhibition de l'enzyme chez les animaux exposés aux sédiments des différents sites, par rapport aux animaux non exposés (Figure 3). Cette inhibition atteint 72% et 56% respectivement chez *Perna perna* exposée au sédiment d'Anza (AN) et à celui de l'embouchure de l'Oued Souss (OS). Chez les mollusques exposés aux sédiments du Cap Ghir (CG), de la Plage Municipale (PM) et du Port (PR), l'inhibition est moins importante avec des pourcentages respectifs de 39%, 27% et 45%. Chez *Donax trunculus*, seuls les sédiments des sites d'OS et de PR inhibent significativement l'activité AChE.

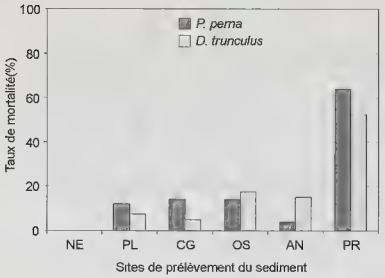


Figure 2. Évaluation du taux de mortalité chez *Perna perna* et *Donax trunculus* exposés pendant 15 jours au sédiment prélevé dans différents sites de la baie d'Agadir: Plage municipale d'Agadir (PL), Cap Ghir (CG), Embouchure de l'Oued Souss (OS), Anza (AN) et Port d'Agadir (PR). (NE correspond aux animaux non exposés)

Concernant l'activité GST (Figure 4), elle montre un profil presque identique chez les deux espèces avec une induction hautement significative chez les animaux exposés au sédiment du site d'AN. Pour les sédiments des sites PL, CG, OS et PR, les niveaux de réponse obtenus ne montrent aucune induction significative en comparaison avec les animaux non exposés.

Quant aux marqueurs de stress oxydant (activité CAT et taux de MDA), ils montrent également un profil à évolution comparable chez *Perna perna* et *Donax trunculus* (Figures 5 et 6). Les taux les plus élevés de MDA ont été enregistrés surtout chez les animaux exposés aux sédiments des sites d'AN, du PR et du CG pour *P. perna* et des sites d'AN, PR, OS et CG pour *D. trunculus*. En ce qui concerne l'activité CAT, son évolution suit celle du taux de MDA, avec une induction significative chez les animaux exposés aux sédiments des sites d'AN et OS (2,1 et 36,31 µmol/mn/mgP pour la CAT et 15 et 1,44 nmol/mgP pour MDA respectivement chez *P. perna* et *D. trunculus* exposés au sédiment AN).

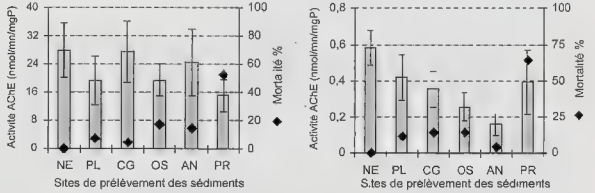


Figure 3. Évaluation de l'activité acétylcholinesterase (AChE) chez *Perna perna* et *Donax trunculus* exposés pendant 15 jours au sédiment prélevé dans différents sites de la baie d'Agadir Plage municipale d'Agadir (PL), CapGhir (CG), Embouchure de l'Oued Souss (OS), Anza (AN) et Port d'Agadir (PR). (NE correspond aux animaux non exposés).

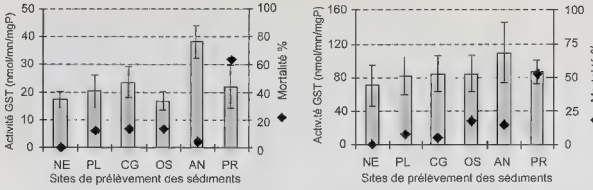


Figure 4 Évaluation de l'activité Glutathion S transferase (GST) chez *Perna perna* et *Donax trunculus* exposés pendant 15 jours au sédiment prélevé dans différents sites de la baie d'Agadir Plage municipale d'Agadir (PL), CapGhir (CG), Embouchure de l'Oued Souss (OS), Anza (AN) et Port d'Agadir (PR). (NE correspond aux animaux non exposés).

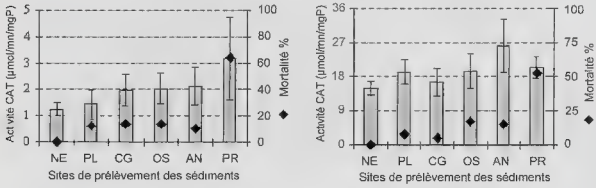


Figure 5 Évaluation de l'activité Catalase (CAT) chez *Perna perna* et *Donax trunculus* exposés pendant 15 jours au sédiment prélevé dans différents sites de la baie d'Agadir Plage municipale d'Agadir (PL), CapGhir (CG), Embouchure de l'Oued Souss (OS), Anza

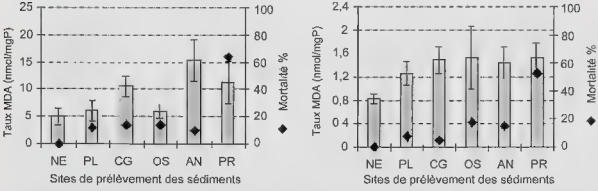


Figure 6 Évaluation du taux de Malondialdéhyde (MDA) chez *Perna perna* et *Donax trunculus* exposés pendant 15 jours au sédiment prélevé dans différents sites de la baie d'Agadir: Plage municipale d'Agadir (PL), CapGhir (CG), Embouchure de l'Oued Souss (OS), Anza (AN) et Port d'Agadir (PR) (NE correspond aux animaux non exposés).

DISCUSSION

Le suivi du taux de mortalité, de la réponse des activités AChE, GST et CAT et du taux de MDA, chez *Perna perna* et *Donax trunculus* exposés à des sédiments originaires de différents sites de la baie d'Agadir, nous a permis d'évaluer l'impact de ces sédiments chez ces deux espèces de bivalves, et par conséquent de nous renseigner sur la qualité de ces sédiments et sur l'état de santé de leur milieu d'origine. Ainsi, les mollusques exposés aux sédiments d'Anza, du Port d'Agadir et de l'embouchure de l'Oued Souss, ont montré des réponses nettes (de la mortalité et/ou des biomarqueurs) par rapport aux animaux non exposés. Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors des études antérieures, basées sur des analyses chimiques, et qui ont montré que le site AN présente une pollution importante en métaux traces (Bari, 1994; Najimi, 1997; Touyer, 1997; Moukrim *et al.*, 2000) et en hydrocarbures aromatiques polycycliques (Kaaya, 2002). Cette pollution est due aux eaux usées domestiques et industrielles de la ville d'Anza qui sont déversées dans le milieu naturel sans aucun traitement préalable. Par ailleurs, des travaux récents (Zekhnini, communication personnelle) ont pu montrer que le Port et les sites qui l'avoisinent, présentent une contamination importante en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Cette pollution serait liée aux différentes activités portuaires qui sont particulièrement abondantes dans ce site, pendant les périodes du repos biologique (4 mois par an) où des centaines de bateaux de pêche restent à quai au port. Pour l'embouchure de l'Oued Souss, en plus des rejets d'eaux usées des agglomérations avoisinantes, l'oued traverse une importante zone agricole. Cette situation constituerait certainement un élément d'explication de l'inhibition de l'AChE enregistrée chez les animaux exposés au sédiment de ce site, qui pourrait être attribuée aux effets des pesticides organophosphorés et carbamates (Morgan *et al.* 1990; Bocquené, 1996; Moukrim, 1987) utilisés en agriculture et drainés par l'Oued Souss au milieu marin.

Dans le cas du site de Cap Ghir, qui est normalement loin de toute activité polluante, les animaux exposés au sédiment de ce site présentent une légère inhibition de l'AChE associée à une faible induction de la CAT et du taux de MDA. Ceci pourrait être dû aux niveaux relativement importants du cadmium dans les masses d'eau associées aux upwellings dans ce site (Najimi, 1997; Moukrim *et al.*, 2000). Ce phénomène pourrait enrichir, en ce métal, les eaux de surface et les sédiments à partir des masses profondes d'eau. Une telle tendance a été décrite par Martin *et al.* (1976) sur les côtes californiennes et par Roméo & Gnassia Barelli (1988) et Sidoumou *et al.* (1999) sur les côtes mauritaniennes.

L'induction de la GST chez les animaux exposés au sédiment d'Anza ne peut être qu'une réponse aux effets de composés organiques de type hydrocarbures, qui seraient présents dans le milieu. Ces contaminants ont un pouvoir inducteur de l'activité GST (van der Oost, 1996) qui a été proposé par plusieurs auteurs comme biomarqueur de ce type de pollution (Monod *et al.*, 1988; Lee, 1988; Suteau *et al.*, 1988; Narbonne *et al.*, 1991a et b; Michel *et al.*, 1993 et 1994, Burgeot *et al.*, 1994 et 1996; Goksoyr, 1995; Solé, 2000). La réponse des marqueurs de stress oxydant (MDA et CAT), enregistrée dans ce site, avec des fortes teneurs en MDA et activités CAT, serait aussi due à la présence de contaminants. En effet, selon Solé (1995) et Labrot *et al.* (1996), ces deux paramètres biochimiques sont induits par des polluants métalliques et organiques.

Dans le cas des mollusques exposés au sédiment du Port d'Agadir, on note l'absence de réponse de certains biomarqueurs, malgré le degré très élevé de pollution du site. Ceci est probablement lié à la réaction de fermeture des valves chez les animaux exposés au sédiment de ce site. Ainsi, pour éviter tout contact avec les contaminants, les animaux ferment leur coquille pour entrer en phase de survie qui serait certainement la cause de la forte mortalité enregistrée dans ce cas. Ce genre de réaction a été décrit par Najimi (1997) lors d'exposition de *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna* à de fortes doses de métaux traces.

L'intérêt et l'originalité de ce travail consistent en l'utilisation de la réponse de paramètres biochimiques chez les mollusques à l'exposition au sédiment pour l'évaluation de l'état de santé dans la baie d'Agadir. En effet, le sédiment constitue un compartiment important au niveau des écosystèmes marins et peut constituer un bon réservoir de contaminants variés tels que les métaux (Lau, 2000) et les composés organiques (Pruel *et al.*, 2000; Lau et Chu, 2000). Des expériences similaires, réalisées sur des organismes terrestres (*Eisenia fetida*) et utilisant les biomarqueurs que nous avons testés, ont validé ces réponses biochimiques et leur utilisation dans la surveillance de la contamination des sols (Ribera *et al.*, 2001).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aebi H E , 1983 Catalase, In Methods of enzymatic analysis (Bergmeyer H.U , Ed.), 3rd ed. Vol 3 273-286

Bari H , 1994 Evaluation du taux de métaux lourds et de quelques paramètres physico-chimiques dans les eaux usées de la ville d'Agadir. Mémoire de CEA, Université Ibn Zohr, Agadir, 20 p

Bocquené G., 1996. L'acétylcholinesterase, marqueur de neurotoxicité Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. Doctorat EPHESVT Toulouse 250 p.

Bocquené G , Galgani F & Truquet P., 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research* **30**. 75–89.

Cheung C C C , Zheng G J , Richardson A.M.Y., Li B.J. & Lam P.K.S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis Aquatic Toxicology* **52**: 189–203.

El Hamidi F., 1995 Contribution à l'étude de la peroxydation lipidique chez deux espèces de moules *Perna perna* BORN (1780) et *Mytilus galloprovincialis* Lamarck (1819), comme bioindicateur de pollution dans la baie d'Agadir. Mémoire de CEA, Université Chouaib Doukkali, El Jadida, 45 p.

Ellman G L , Courtney K.D., Andres V. & Featherstone R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**: 88-95

Habig W H , Pabst M J. & Jakoby W B , 1974 Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**: 7130-7139.

Kaaya A , 2002 Contribution à l'évaluation de l'état de santé de la baie d'Agadir. Etude physicochimique du milieu et de certains biomarqueurs chez *Mytilus galoprovincialis* et *Perna perna* (Stratégie de réserves, bioaccumulation métallique, et enzymes de biotransformation) Thèse de Doctorat d'État, Université Ibn Zohr, Agadir, 213 p.

Kaaya A., Najimi S., Ribera D., Narbonne J. F. & Moukrim A., 1999. Characterization of Glutathion S-transferase (GST) Activities in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* used as Biomarker of Pollution in the Agadir Bay (South of Morocco). *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* **62**(5): 623-929.

Labrot F., Ribera D., Saint Denis M. & Narbonne J. F., 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxydation, acetylcholinesterase, catalase and glutathion peroxidase activities in tree non-mammalian species. *Biomarkers* **1**: 21-28.

Lagbouri A., 1997. Etude de la biologie de *Donax trunculus* dans la Baie d'Agadir et de sa Réponse à la Pollution à travers trois Biomarqueurs (Acetylcholinesterase, peroxydation lipidique et Glutathion S-transferase). Thèse de Doctorat de 3ème cycle. Agadir, 170 p.

Lau S.S.S., 2000. The significance of temporal variability in sediment quality for contamination assessement in a coastal wetland. *Water Research* **34**(2): 387-394.

Lau S.S.S. & Chu L.M., 2000. The significance of sediment contamination in a coastal wetland, hong kong china. *Water Research* **34**(2): 379-386.

Lee R.F., 1988. Glutathione S-transferase in marine invertebrates from Langesundfjord. *Marine Ecology Progress Series* **46**: 3-36.

Lowry W.H., Rosenbrouch H.J., Farr A.L. & Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.

Martin J.H., Brulan K.W. & Broenkow W.W., 1996. Cadmium transport in the california current. In: Windom H.L. & Duce R.A. (ed.) Marine pollutant transfert. Lexington, Lexington Books. 159-184.

Michel X.R., Salaun J.P., Galgani F. & Narbonne J.F., 1994. Benzo(a)pyrene hydroxylase activity in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a potent marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* **38**. 257-273.

Monod G., Devaux A. & Rivière J.L., 1988. Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhône. *Science of the Total Environment* **73**: 189-201.

Mora P., 1998. Caractérisation des cholinestérases de trois mollusques bivalves *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* et *Corbicula fluminea*. Contribution au développement d'un biomarqueur de contamination des milieux marin et dulçaquicole. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux I. 260 p.

Moukrim A., 1987. Action de pesticides organophosphorés sur le mollusque *Lymnaea peregra* Muller. Etude Biochimique, Histologique et Histochimique. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, 133 p.

Moukrim A., Kaaya A., Najimi S., Roméo M. & Gnassia Barelli M., 2000. Assessement of the trace metals level in two species of mussel of Agadir marine bay (South of Morocco). *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* **65**. 478-485.

Najimi S., Bouhaimi A., Daibeze M., Zekhnini A., Pellerin J., Narbonne J.F. & Moukrim A., 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **58**: 901-912.

Narbonne J.F. (sous presse). Etudes sur le terrain des biomarqueurs au cours des campagnes de prélèvements en Méditerranée en Baltique et sur le bassin d'Arcachon.

Narbonne J.F., Ribera D , Michel X , Raoux C , Garrigues P , Manaud J L , Lemaire F., Roméo M , Salaun J P & Lafaurie M , 1991. Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin étude comparative en mer Méditerranée. *Oceanis* **17**(3): 257-275.

Narbonne J.F., Garrigues P , Ribera D., Raoux C , Mathieu A , Lemaire P , Salaun J P & Lafaurie M , 1991 Mixed-function oxygenase enzymes as tool for pollution monitoring: field studies in the French coast of the Mediterranean sea. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **100**: 37-42

Ribera D , Narbonne J F , Arnaud C & Saint-Denis M , 2001 Biochemical responses of earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl *Soil Biology & Biochemistry* **33**: 1123-1130.

Roméo M & Gnassia-Barelli M , 1988 *Donax trunculus* and *Venus verrucosa* as bioindicators of trace metal concentration in Mauritanian costal waters. *Marine Biology* **99**: 227.

Sidoumou Z , Gnassia-Barelli M , Srau Y & Roméo M , 1999 Etude des métaux lourds chez deux mollusques prélevés sur les côtes mauritanienne, *Crassostrea gigas* et *Perna perna*. *Journal de Recherche Oceanographique* **24**(1). 13-18

Solé M , Porte C & Albaiges J , 1995. Seasonal variation in the mixed function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel Mytilus galloprovincialis *Environmental Toxicology and Chemistry* **14** 157 -164

Solé M , Porte C , Barcelo D & Albaiges J , 2000 Bivalves residue analysis for the assessment of coastal pollution in the Ebro Delta, NW Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin* **40**(9) 746-753.

Sunderman F W Jr, Marzouk A , Hopfer S.M., Zaharia O. & Reid M C ,1985 Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats *Annals of Clinical and Laboratory Science* **15**(3) 229 236

Suteau P M., Daubeze M , Migaud M.L & Narbonne J F , 1988. PAH-metabolizing enzymes in whole mussels as biochemical tests for chemical pollution monitoring. *Marine Ecology Progress Series* **46** 45-49

Toyer O., 1997 Eaux usées dans le grand Agadir Impact sur l'environnement et épuration dans le système infiltration-percolation de Ben Sergao (étude physico chimique et parasitologique Thèse de Doctorat de 3ème cycle, Université Ibn Zohr, Agadir. 183 p.

van der Oost R , Goksoyr A , Celander M , Heida H. & Vermeulen N.P E , 1996 Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II Biomarkers pollution- induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology* **36**: 189-222.

Viarengo A , Canesi L , Pertica M , Poli G., Moore M.N. & Orunesu M , 1990. Heavy metal effect on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, **97**: 37 42.

Variabilité morphologique et systématique de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Bivalvia, Mytilidae) au Maroc

Hassane JAZIRI[1] et Laïla SBABOU[1]

ABSTRACT

Morphological variation and systematics of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Bivalvia: Mytilidae) in Morocco.

The morphological variation is investigated in eight populations of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Mediterranean and the Atlantic coasts of Morocco. Their systematic status was previously established using allozyme and nuclear DNA markers. The criteria analysed here are the most commonly used in the *M. galloprovincialis-M. edulis* diagnosis. Factor analysis of correspondence (AFC) applied to morphological data show that the within-population diversity is wide and very similar in the Mediterranean and the Atlantic populations, and reveal that *M. galloprovincialis* and *M. edulis* morphotypes are simultaneously present, but in a small ratio compared to intermediate forms whose are the most frequent. These results lead to understand the diagnostic difficulties and the sources of confusion generated by the use of morphologic criteria raised in previous studies concerning Moroccan samples, and confirm the limit of these criteria in the perispecific systematics of the genus *Mytilus*. This study reveals also that the intermediate forms do not exist only in the zone of sympatry and hybridization between *M. galloprovincialis* and *M. edulis*. We show here their dominance in a geographic area restricted to *M. galloprovincialis*. This situation seems to be rather explained by the high phenotypic plasticity of the morphologic criteria directly submitted to the action of ecological factors.

RÉSUMÉ

La variabilité morphologique est analysée au niveau de huit populations de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* provenant des côtes atlantique et méditerranéenne du Maroc, préalablement identifiées grâce aux marqueurs allozymiques et d'ADN nucléaire. Les caractères retenus ici sont les plus communément utilisés dans la diagnose entre *M. galloprovincialis* et *M. edulis*. Le traitement des données par l'analyse factorielle des correspondances révèle que l'ensemble des stations étudiées présentent des profils de variabilité intrapopulationnelle assez larges et très similaires, marqués par la présence simultanée des morphotypes «*edulis*» et «*galloprovincialis*» en faibles proportions et la dominance des formes intermédiaires. Ces résultats permettent de comprendre les difficultés de détermination et les sources de confusion engendrées par l'utilisation des caractères morphologiques soulevées dans les travaux antérieurs réalisés au

[1] Laboratoire de Zoologie Faculté des Sciences, B P 1014, Avenue Ibn Batouta, Agdal, 10 106 Rabat Maroc.
e-mail: hassanjaziri@hotmail.com

Maroc, et confirment ainsi la limite de ces caractères en biosystématique périspécifique du genre *Mytilus*. Cette étude montre également que les formes dites intermédiaires n'existent pas uniquement à l'intérieur de la zone de sympatrie et d'hybridation entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis*. Nous mentionnons ici leur prépondérance dans une aire géographique restreinte au taxon *M. galloprovincialis*. Une telle situation semble s'expliquer plutôt par la forte plasticité phénotypique des caractères morphologiques sous l'influence des facteurs du milieu.

INTRODUCTION

La distribution géographique du genre *Mytilus* (Bivalvia: Mytilidae) est très large. Elle englobe en effet de vastes régions antitropicales des zones médiolittorale et infralittorale des cinq continents (Lubet, 1973, Koehn, 1991; McDonald *et al*., 1991; Daguin & Borsa, 2000). Sa systématique établie sur la base des caractères morphologiques pose un problème de détermination des espèces à l'échelle mondiale (Lubet, 1959; 1971; Seed, 1971; Gosling, 1984, 1992; Gardner, 1992). Les caractères morphologiques les plus communément utilisés dans la diagnose des taxons de ce genre sont la forme et la couleur de la coquille, la forme de l'empreinte du muscle adducteur antérieur, l'aspect et la taille du muscle adducteur postérieur et le nombre de dents cardinales. Sur la base de ces critères, huit taxons ont été décrits (cf Lubet, 1973): *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. planulatus*, *M. platensis*, *M. chilensis*, *M. desolationis*, *M. coruscus* et *M. californianus*.

Au Maroc, les populations naturelles de ce genre sont abondantes et couvrent de larges territoires de la zone intertidale des côtes atlantique et méditerranéenne. Les travaux antérieurs basés sur la morphologie mentionnent la présence de deux taxons *M. galloprovincialis* et *M. edulis* sur les côtes atlantique et méditerranéenne. Ainsi Pasteur-Humbert (1962) signale la présence de *M. edulis* sur la côte atlantique depuis Tanger jusqu'à Agadir, et de *M. galloprovincialis* en Méditerranée et en Atlantique (de Mélilla à Agadir). Le même auteur cite uniquement *M. galloprovincialis* sur la côte atlantique à partir d'un inventaire couvrant la région de Rabat au nord (Bellon Humbert, 1971) et la province de Tarfaya au sud (Bellon Humbert, 1972). Lubet (1973) mentionne la présence de *M. galloprovincialis* en Méditerranée et en Atlantique, cite *M. edulis* sur la côte atlantique et la considère comme accidentelle en Méditerranée. D'après Seed (1978), Lubet *et al.* (1984) et Dardignac-Corbeil (1986), *M. edulis* occupe une aire géographique plutôt boréale, sa limite méridionale s'arrête au Portugal, tandis que *M. galloprovincialis* occupe la Méditerranée et la côte atlantique jusqu'à la Manche. Menioui (1988) rapporte la présence des deux espèces sur les deux façades du littoral marocain. Coustau (1991) cite la présence de *M. galloprovincialis* en Méditerranée et des deux espèces *M. galloprovincialis* et *M. edulis* sur le littoral atlantique nord du Maroc. Enfin, deux taxons *M. galloprovincialis* et une espèce indéterminée *Mytilus sp* sont citées parmi la malacofaune de la lagune de Nador en Méditerranée marocaine (Zine & Menioui, 1992).

L'objet du présent travail est d'examiner les caractères morphologiques les plus communément utilisés pour différencier *M. galloprovincialis* de *M. edulis*, sur plusieurs échantillons représentant les populations de l'ensemble des côtes marocaines depuis l'extrémité Est de la Méditerranée jusqu'aux zones les plus méridionales du Sahara marocain. L'analyse des données obtenues aidera à caractériser la variabilité morphologique aux niveaux intra et inter-populations, à comparer ces résultats à ceux obtenus par la génétique moléculaire utilisant les marqueurs allozymiques (Jaziri et Benazzou, 1997; 2001) et d'ADN nucléaire (Daguin et Borsa, 1999) qui ont clairement établi la présence exclusive de *M. galloprovincialis* sur les côtes atlantique et méditerranéenne du Maroc, et au delà à comprendre les sources de controverses citées plus haut.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Huit stations du littoral marocain ont été échantillonnées (Figure 1). Il s'agit de Nador en Méditerranée, Ksar-Sghir située au niveau du détroit de Gibraltar et d'Asilah, Guy-ville, Essaouira, Taghazout, Tantan et Dakhla sur la côte atlantique. Dans chaque station, un échantillon de 50 individus adultes récoltés au hasard à l'intérieur d'une large superficie de la zone intertidale exondant à marée basse a été prélevé. Les collectes ont eu lieu au cours de trois campagnes allant de janvier 1997 à juin 2000. Ainsi les échantillons de Dakhla et Guy ville ont été collectés en janvier 1997; Nador, Ksar-Sghir et Asilah, en avril 1997 et enfin Essaouira, Taghazout et Tantan en juin 2000. Les individus prélevés ont été ramenés vivants au laboratoire dans une glacière. Les coquilles vidées, nettoyées et séchées à l'étuve (48 heures à 50°C) ont été ensuite examinées au niveau des caractères morphologiques suivants: forme de la coquille, forme de son sommet, forme de l'empreinte du muscle adducteur antérieur, nombre de dents cardinales et taille du muscle adducteur postérieur. Les observations ont été effectuées à l'œil nu, puis vérifiées à la loupe binoculaire (Olympus C 011, agrandissement de 5 à 50 fois) pour les trois derniers caractères. Conformément aux descriptions données aux deux taxons dans les clés de détermination (Lubet, 1973) et les travaux antérieurs (cf. Gardner, 1992; Gosling, 1992), les cinq caractères retenus dans la présente étude ont été éclatés chacun en deux modalités portant l'indice « g » comme référence à *M. galloprovincialis* ou « e » à *M. edulis*. Le codage de l'ensemble de ces variables est résumé dans le Tableau 1. La matrice des données brutes ainsi obtenue correspond à un tableau disjonctif complet dont les colonnes représentent les variables éclatées chacune en deux modalités (g ou e), et les lignes correspondent aux individus. Chaque individu est représenté par une combinaison aux variables retenues selon un codage qualitatif: présence de la modalité (1), absence (0). La matrice a été ensuite soumise à une analyse factorielle des correspondances ou AFC (Benzécri, 1982) utilisant la version 6 du logiciel Statistica. L'AFC offre en effet l'avantage de pouvoir explorer à la fois la diversité intra échantillons (ici intrapopulationnelle)

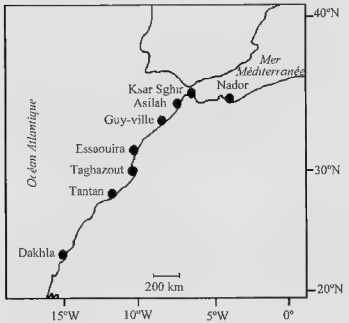


Figure 1. Localisation des sites d'échantillonnage des populations de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* sur les côtes atlantique et méditerranéenne du Maroc

Tableau 1. Codage des variables morphologiques étudiées dans huit populations marocaines de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis*

Caractères	modalités	Codes
Forme de la coquille	Subquadrangulaire	A_g
	arrondie	A_e
Forme du sommet de la coquille	Creuse	B_g
	plate	B_e
Forme de l'empreinte du muscle adducteur antérieur	Ovale	C_g
	arrondie	C_e
Nombre de dents cardinales	3 ou 4	D_g
	2	D_e
Taille du muscle adducteur postérieur	Bien développé	E_g
	Peu développé	E_e

et inter-échantillons (inter-populations). Ceci permet, par analyse comparée des projections bidimensionnelles aux axes ayant les plus forts taux d'inertie (i.e. apportant le plus d'information), d'évaluer la variabilité morphologique aussi bien à l'intérieur des stations qu'à l'échelle de l'aire de répartition sur l'ensemble des côtes marocaines.

RÉSULTATS

L'analyse des projections bidimensionnelles F_1-F_2, F_1-F_3 et F_2-F_3 de l'AFC appliquée aux variables morphologiques montre une grande diversité intrapopulationnelle dans l'ensemble des stations analysées, aussi bien celles de Méditerranée (Nador et Ksar Sghir) que celles du littoral atlantique (Asilah, Guy ville, Essaouira, Taghazout, Tantan et Dakhla). Les profils des deux populations montrant les nuages de points le plus étendu (Asilah) et le plus rétréci (Taghazout) sont données ci-après (Figure 2). Les autres populations possèdent des profils de dispersion intermédiaires et très comparables: les nuages de points formant les projections bidimensionnelles représentant les différentes populations montrent en effet un haut degré de chevauchement, synonyme de ressemblance morphologique. Rappelons à ce propos qu'au niveau de ces projections, chaque point représente soit un individu ou un groupe d'individus identiques possédant la même combinaison de modalités aux différents caractères analysés soit simplement des individus ayant les mêmes coordonnées sur les deux axes pris en compte sans toutefois qu'ils soient totalement identiques Cette deuxième possibilité contribue, lorsqu'elle se produit, à sous estimer la diversité intrapopulationnelle; mais n'altère en rien la validité et la fiabilité de l'analyse.

Dans toutes les stations analysées, les prototypes définis dans les travaux pionniers en tant que «*M. galloprovincialis*» (individus possédant dans notre analyse la modalité g à toutes les variables) et «*M. edulis*» (la modalité e partout) sont présents en très faibles proportions, voire même absents dans certaines stations (Figure 3). En effet, la fréquence du morphotype «*edulis*» varie de 0 dans les stations de Ksar Sghir et Tantan à 10% à Taghazout et Essaouira; tandis que celle de «*galloprovincialis*» oscille entre 0 (Essaouira et Tantan) et 12% à Guy-ville. Les formes les plus abondantes sont essentiellement des formes intermédiaires possédant un mélange de modalités «g» et «e» en prévalences différentes. Leur proportion la plus basse à l'intérieur des

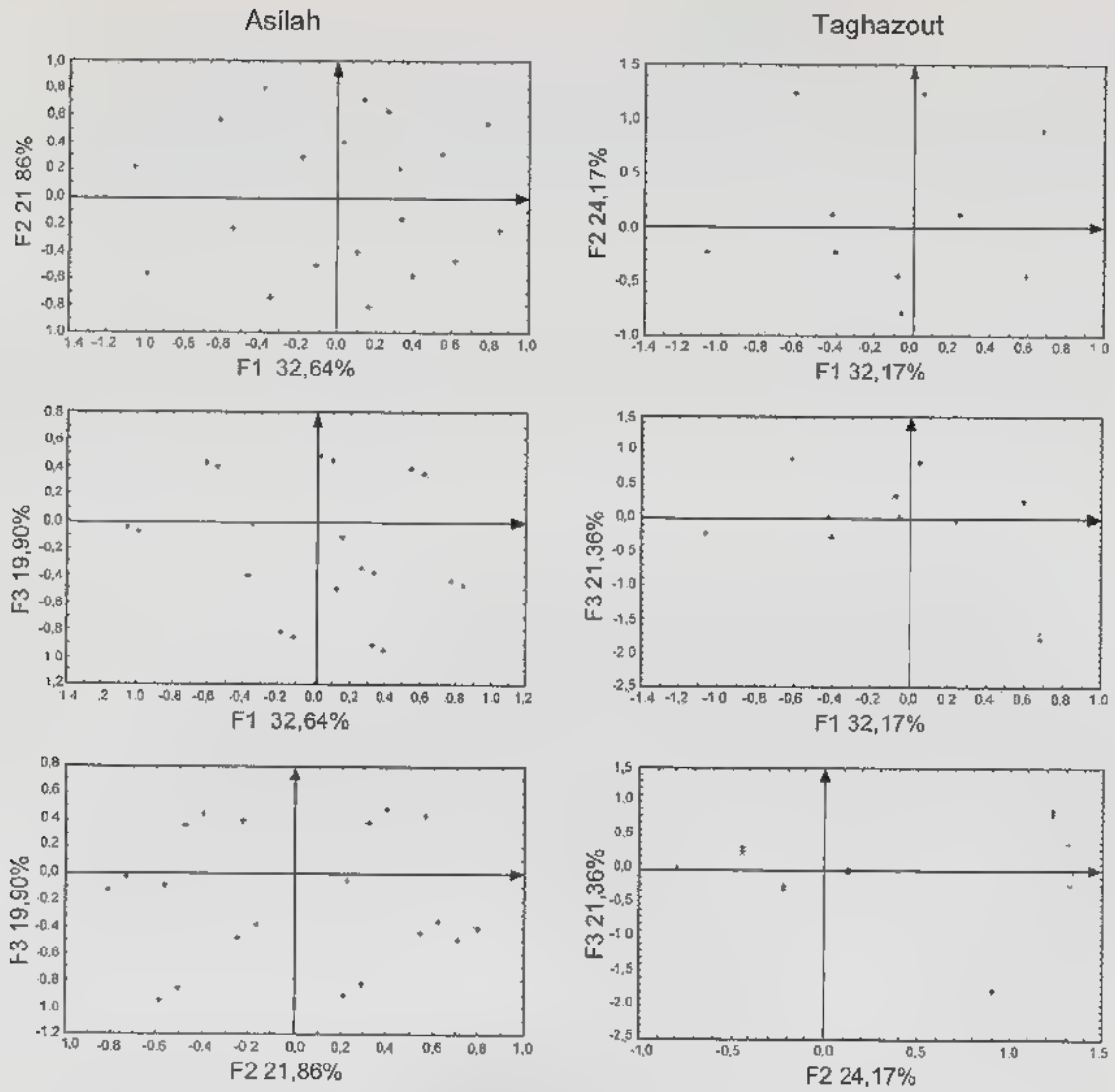


Figure 2 Projections bidimensionnelles (F_1 F_2, F_1 F_3, F_2-F_3) de l'AFC appliquée à cinq variables morphologiques dans deux populations marocaines de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* Asilah à gauche et Taghazout à droite

populations étudiées est enregistrée à Guy-ville (82%), alors que le maximum est atteint à Tantan (100%). Dans chaque station, les trois premiers axes de l'AFC apportent plus de 50% de l'information totale (Tableau 2). Les taux varient en fait de 55,73% dans la population de Dakhla à 78,89% à Tantan. La moyenne établie sur l'ensemble des populations s'élève à 68,17% dépassant ainsi les 2/3 de l'information totale. Les trois premiers axes sont essentiellement expliqués par peu de variables. En effet, pour chaque axe, trois variables seulement (Tableau 3) apportent ~50% ou plus de l'information totale. Plus exactement, ces valeurs varient de 49,6% pour l'axe F_1 à Nador, à 90,3% pour F_3 à Taghazout. Mais, il est important de noter que les variables les plus explicatives ne sont pas toujours les mêmes ni pour chaque axe ni dans chaque population.

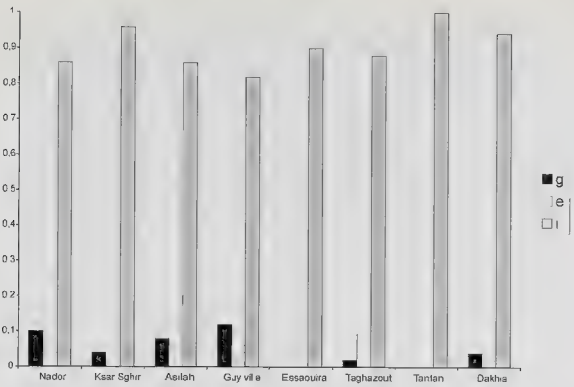


Figure 3 proportions des types morphologiques dans huit populations marocaines de la moule méditerranéenne *M galloprovincialis* g morphotype «*galloprovincialis*», e. morphotype «*edulis*», i forme intermédiaire

Tableau 2 Taux d'inertie (en %) des trois premiers axes de l'AFC dans huit populations marocaines de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis*

Populations	Axes Factoriels			
	F_1	F_2	F_3	Total
Nador	24,67	19,75	16,96	61,38
Ksar Sghir	35,05	23,54	17,03	75,62
Asilah	32,64	21,86	19,90	74,40
Guy ville	22,03	21,30	14,91	58,24
Essaouira	25,79	22,55	15,10	63,44
Taghazout	32,17	24,17	21,36	77,70
Tantan	31,98	27,87	19,04	78,89
Dakhla	22,22	17,74	15,77	55,73
Moyenne	28,32	22,34	17,51	68,17

Tableau 3. Contributions relatives (en %) des principales variables à l'inertie des trois premiers axes de l'AFC dans huit populations marocaines de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* - : valeur inférieure à la plus faible valeur affichée de la colonne considérée.

	Nador			Ksar Sghir			Asilah			Guy-ville			Essaouira			Taghazout			Tantan			Dakhla		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
A_g	-	-	26.3	22.3	-	-	-	-	-	10.3	-	-	13.8	17.8							-	-	-	12.2
A_e	13.8		-		-		20.5									17.9	-	-	-	-	-	16		
B_g	-	-	-	-	-	-	18.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44.6	-	26.4			15.5	-
B_e	-	-	15.2	-	-	-	-	-	-	-	-	12.7	-	-	10.9	-	-	12.6	-	-	-	-	-	
C_g	19.6	-	-	13.7	13	28.2	-	-	15.4	-	-	-	-	-	-	13.1	-	-	-	-	30.7	-	-	17.8
C_e	17.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.5	-	-	13.3	-	-	22.3	-	-	-	28.4	-	-	-
D_g	-	14.5	-	-	-	21.4	15.7			27.1		53.9			-	-	-	33.1	-	14.8	-			
D_e	-	8.7	-		54.8	23.1	-	30.6	24.8	-	13.8	17.6	-	27					23.2		13.7	13	10.3	-
E_g		-						22.2	-	30.5	-	-	17.5	-	41.3	-	21.1	-	19.4	-	-		37.3	-
E_e	-	28.4	28.6	14.5	8.1	-	-	15.6	17.5	-	13.4	-	16.8	-	33.5	18.7	13.4	-	25.9	35.4	-	22.7	-	31.4
Total	49.6	51.6	67.1	50.5	75.9	72.7	54.8	68.4	57.7	67.8	50.7	84.2	47.9	58.1	85.7	49.7	58.8	90.3	68.5	76.6	72.8	51.7	63.1	61.4

DISCUSSION

Les travaux antérieurs concernant la systématique du genre *Mytilus* réalisés au Maroc, et basés exclusivement sur la morphologie (Pasteur-Humbert, 1962; Bellon Humbert, 1971; 1972; Menioui, 1988; Zine et Menioui, 1992), reposent sur un petit nombre d'individus, examinés souvent sur peu de caractères et menés dans le cadre général de l'inventaire des Mollusques marins des côtes marocaines. Nous utilisons dans la présente étude une approche au niveau populationnel basée sur un échantillonnage conséquent, ayant l'avantage de ne pas écraser les différences, lorsqu'elles existent, entre individus d'une même station. Les travaux antérieurs réalisés chez la même espèce et utilisant ce type d'approche ont montré l'existence d'une forte variabilité morphologique entre individus d'une même localité (Beaumont *et al.*, 1989; Baverstock et Moritz, 1990; McDonald *et al.*, 1991, Seed, 1972; 1992). Les résultats obtenus ici révèlent également une forte variabilité morphologique à l'intérieur de toutes les populations analysées aussi bien celles de Méditerranée que celles du littoral atlantique. Dans chaque station, les morphotypes «*galloprovincialis*» et «*edulis*» sont rares à absents tandis que les formes intermédiaires sont les plus fréquentes. Ces résultats sont incompatibles aux données génétiques obtenues sur les mêmes populations à partir des mêmes échantillons (Jazin et Benazzou, 1997; 2001; Jazin *et al.*, 1999). En effet, d'après les marqueurs allozymiques, surtout les locus les plus diagnostiques entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* clairement établis d'après les travaux pionniers (Skibinski *et al.*, 1980) et universellement utilisés (cf. Koehn, 1991; Gardner, 1992), à savoir MPI, ODH, EST-D, LAP et GPI, tous les individus analysés dans l'ensemble des stations appartiennent au taxon *M. galloprovincialis*. Par conséquent, aussi bien en Méditerranée que sur le littoral atlantique, seul le

taxon *M. galloprovincialis* est présent. D'autres résultats de génétique moléculaire utilisant un marqueur d'ADN nucléaire, le locus mac-1 (Daguin et Borsa, 1999) menées sur trois populations marocaines: Dakhla (analysée également ici), Témara (très proche de Guy ville) et Tétouan (à ~ 30 km de Ksar Sghir) confortent la présence exclusive de *M. galloprovincialis* sur les côtes atlantique et méditerranéenne du Maroc. Cette incompatibilité, loin de remettre en cause l'apport des marqueurs moléculaires nettement plus fiables, montre clairement l'insuffisance des caractères morphologiques à établir une diagnose précise et satisfaisante des espèces de ce genre. Plusieurs auteurs (Seed, 1971; Lubet, 1973, Gosling, 1984; Beaumont *et al.*, 1989, Koehn, 1991; McDonald *et al.*, 1991) avaient d'ailleurs soulevé les difficultés de distinction des deux taxons *M. galloprovincialis* et *M. edulis* sur la base des caractères morphologiques. En fait, même si parfois des différences assez discriminantes sont mises en évidence (Grant et Cherry, 1985; Beaumont *et al.*, 1989), aucun caractère morphologique à lui seul ne peut être diagnostique entre les deux taxons (Gosling, 1984). Le recours aux marqueurs allozymiques a permis de résorber ces difficultés sur le littoral atlantique d'Europe et a permis de trancher en faveur de la présence exclusive de *M. galloprovincialis* dans la zone méridionale comprenant le littoral atlantique de la péninsule ibérique et la rive nord de la Méditerranée occidentale (Sanjuan *et al.*, 1994; Quesada *et al.*, 1995a), de *M. edulis* dans la zone la plus septentrionale (Bevolden et Garner, 1986; Varvio *et al.*, 1988) et des deux au centre dans la zone d'hybridation comprise entre les deux précédentes (Skibinski *et al.*, 1978; 1983, Coustau *et al.*, 1991, Vainola et Hvilsom, 1991). Les données d'ADN mt (Edwards et Skibinski, 1987; Skibinski et Edwards, 1987; Quesada *et al.*, 1995b, Sanjuan *et al.*, 1996) et d'ADN nucléaire (Daguin *et al.*, 2001) ont conforté les résultats précédents. A une échelle plus large, les marqueurs moléculaires ont permis de réviser la systématique du genre *Mytilus* dans plusieurs régions du monde de sorte qu'actuellement trois taxons seulement sont reconnus valides: *M. edulis*, *M. galloprovincialis* et *M. trossulus* (revues in Koehn, 1991; Daguin et Borsa, 2000) au lieu des huit évoqués plus haut, établis à partir des données morphologiques (cf. Lubet, 1973).

Par ailleurs, les résultats obtenus dans la présente étude permettent de mieux comprendre les sources de controverses dégagées à travers les travaux antérieurs mentionnant, à tort, la présence de *M. edulis* sur les côtes marocaines; et qui s'expliqueraient selon toute vraisemblance par la forte variabilité morphologique que recèlent les populations marocaines de *M. galloprovincialis*, caractérisées par la prédominance des formes intermédiaires. Ce qui rend sans doute la détermination délicate et peu fiable en raison de la présence simultanée chez un même individu de caractères de type «*edulis*» et de type «*galloprovincialis*». Concernant les formes intermédiaires, ces dernières ont jusque là été décrites uniquement à l'intérieur de la zone d'hybridation entre *M. galloprovincialis* et *M. edulis* située sur le littoral atlantique d'Europe depuis le nord de l'Espagne jusqu'aux Iles Britanniques (Seed, 1971; Lubet, 1973) et sont interprétées comme le résultat d'hybridation et d'introgressions réciproques entre les génotypes «*M. galloprovincialis*» et «*M. edulis*» (Skibinski *et al.*, 1983, Coustau *et al.*, 1991, Daguin *et al.*, 2001). Nous montrons ici leur prépondérance dans une zone restreinte au génotype «*M. galloprovincialis*». Par conséquent, leur présence en grande quantité sur les côtes marocaines s'expliquerait plutôt par une forte influence des facteurs extérieurs du milieu exercée sur les caractères morphologiques, conditionnant ainsi les modalités d'expression d'un même caractère en dépit de la présence d'un seul génotype, ici «*M. galloprovincialis*». La plasticité phénotypique des caractères de la coquille invoquée ici est en effet un phénomène bien connu chez les bivalves marins; en particulier chez les moules du genre *Mytilus* (Seed, 1968).

CONCLUSION

Si les caractères morphologiques montrent leur limite à diagnostiquer à l'échelle périspécifique à l'intérieur du genre *Mytilus*, ces mêmes caractères (formes des empreintes des muscles adducteurs antérieur et postérieur, nombre de dents cardinales et forme de la coquille) sont hautement diagnostiques à une échelle supérieure, en particulier entre la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* et la moule africaine *Perna perna* (Soot Ryen, 1955; Lubet, 1973) également très abondante sur les côtes atlantique et méditerranéenne du Maroc (Pasteur-Humbert, 1962, Bellon Humbert, 1972; Shafee, 1989; 1992), en Algérie (Abada Boudjema et Moueza, 1981; Abada Boudjema *et al.*, 1984) et en Tunisie (Zaouali, 1973). Aussi, il nous semble primordial d'inclure l'analyse de ces caractères dans toute étude visant à définir le statut taxinomique d'une entité douteuse ou non clairement identifiée. Seule une comparaison avec les données génétiques, biochimiques, physiologiques, et parfois même éthologiques peut situer clairement leur intérêt et leur contribution à des fins de biosystématique à n'importe quelle échelle que ce soit. D'ailleurs, même à l'intérieur du genre *Mytilus*, certains auteurs (Lubet, 1959; Le Gall, 1969, Grant et Cherry, 1985; Beaumont *et al.*, 1989) arrivent à distinguer entre les deux taxons *M. galloprovincialis* et *M. edulis* sur la base des caractères morphologiques, mais en se basant sur une approche quantitative de la variabilité à ces caractères (calcul de moyennes, élaboration d'histogrammes ou de courbes linéaires à partir des données biométriques). McDonald *et al.* (1991) sont arrivés également à séparer entre les trois taxons *M. edulis*, *M. galloprovincialis* et *M. trossulus* à partir d'une analyse multivariée appliquée aux variables morphologiques. Cependant, ces mêmes auteurs reconnaissent que les différences émanant de telles caractérisations n'ont de valeur qu'en zone de sympatrie pour des populations représentant des taxons différents (*M. edulis* et *M. galloprovincialis* par exemple) vivant sous les mêmes conditions écologiques et soumises aux mêmes contraintes du milieu (cf. Grant et Cherry, 1985; Dardignac Corbeil, 1986). La démarche la plus judicieuse, adoptée d'ailleurs par plusieurs auteurs, qui permet d'aboutir à une bonne diagnose, est d'utiliser une combinaison d'approches complémentaires intégrant à côté des caractères morphologiques, les marqueurs allozymiques (Beaumont *et al.*, 1989, Gosling, 1984; McDonald *et al.*, 1991), d'ADN-mt (Skibinski *et al.*, 1983), ou les deux (Karakousis et Skibinski, 1992). A l'avenir, on assistera vraisemblablement à l'intégration des marqueurs d'ADN nucléaire dans ce genre de situations. D'ores et déjà, certains locus comme mac-1 (Daguin et Borsa, 1999; Daguin *et al.*, 2001) et Glu 5' (Daguin et Borsa, 2000) se révèlent diagnostiques entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis*.

RÉFÉRENCES

Abada-Boudjema Y & Moueza M, 1981 Structure des populations d'une moulière naturelle en baie d'Alger. *Acta Oecologica, Oecologia generalis*, **2**(2): 183-194

Abada Boudjema Y, Altes J & Moueza M, 1984 Croissance comparée de deux espèces de moules *Mytilus galloprovincialis* Lmk et *Perna picta* L. dans une moulière naturelle de la baie d'Alger *Haliotis* **14** 33-38

Baverstock P R & Moritz C, 1990 Sampling design. In Molecular systematics. (D M Hillis & C Moritz eds.): 13-24. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets

Beaumont A R, Seed R & Garcia Martinez P, 1989. Electrophoretic and morphometric criteria for the identification of the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* In Reproduction, genetics and

distributions of marine organisms. (J.S. Ryland & P.A. Tyler eds): 251-258. Olsen and Olsen Publishers, Fredensborg, Denmark.

Bellon Humbert C., 1971 Complément à l'étude faunistique des mollusques marins de la région de Rabat *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles et Physiques du Maroc* **51**. 195-202.

Bellon Humbert C., 1972. Inventaire des Mollusques marins vivants recueillis sur la côte de la province de Tarfaya par le Professeur J.B. Panouse *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles et Physiques du Maroc* **52**. 85-105

Benzécri J.P., 1982. L'analyse des correspondances Dunod, Paris.

Coustau C., 1991. Analyse génétique et physiologique des interactions hôte-parasite: le système *Prosorhynchus – Mytilus*. Thèse de doctorat, Université Montpellier II (France): 133 p.

Coustau C., Renaud F. & Delay B., 1991 Genetic characterisation of the hybridization between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on the Atlantic coast of France *Marine Biology* **111**: 87-93.

Daguin C. & Borsa P., 1999 Genetic characterisation of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in North West Africa using nuclear DNA markers *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **235**: 55-65

Daguin C. & Borsa P., 2000 Genetic relationships of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck worldwide evidence from nuclear DNA markers In: The Evolutionary Biology of the Bivalvia (E.M. Harper & J.D. Taylor eds.): 389-397. Geological Society, London, Special Publication.

Daguin C., Bonhomme F., Borsa P., 2001. The zone of sympatry and hybridization of *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*, as described by intron length polymorphism at locus mac-1. *Heredity* **86**(3): 342-354.

Dardignac-Corbeil M.J., 1986 La mytiliculture traditionnelle. In: Aquaculture, volume 1. (G. Barnabé ed.). 286-329. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.

Edwards C.A. & Skibinski D.O.F., 1981 Genetic variation of mitochondrial DNA in mussel (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) populations from South West England and South Wales *Marine Biology* **94**: 547-556

Fevolden S.E. & Garner S.P., 1986 Population genetics of *Mytilus edulis* (L.) from Oslofjorden, Norway, in oil-polluted and non oil-polluted water *Sarsia* **71**: 247-257.

Gardner J.P.A., 1992 *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) (Bivalvia: Mollusca) the taxonomic status of the Mediterranean mussel. *Ophelia* **35**(3): 219-243

Gosling E.M., 1984. The systematic status of *Mytilus galloprovincialis* in Western Europe: a review *Malacologia* **25**. 551-568

Gosling E.M., 1992 Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. In: The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture (Gosling E.M. ed.). Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 25, Elsevier, Amsterdam: 1-20.

Grant W.S. & Cherry M.I., 1985 *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in South Africa *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **90**: 179-191.

Jaziri H. & Benazzou T., 1997 Biogéographie évolutive des *Mytilidae* des côtes marocaines: statut taxinomique et répartition géographique. Abstracts du Premier Congrès National de Génétique et de Biologie Moléculaire, Agadir (Maroc) 14-17 Novembre: p. 60.

Jaziri H. & Benazzou T., 2001 Les populations du genre *Mytilus* au Maroc: statut taxinomique et répartition géographique. Rapport du 36e Congrès de la CIESM, Monaco (Monte Carlo): 394

Jazmi H, Yahyaoui A, Riad L & Benazzou T, 1999 Diversité génétique des ressources marines du littoral marocain contribution à une meilleure exploitation Proceedings of the First International Conference on Biodiversity and renewable natural resources preservation, Ifrane (Morocco), May 13-15. 237 243

Karakousis Y & Skibinski D.O F, 1992 An analysis of allozyme, mitochondrial DNA and morphological variation in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) populations from Greece. *Experentia* **48**: 878-881.

Koehn R K, 1991 The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus* *Aquaculture* **94** 125-145

Le Gall P, 1969 Etude des moulières normandes· renouvellement, cycle, croissance Thèse de Doctorat, Université de Caen (France), 71 p

Lubet P., 1959 Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **23**(3): 384-548

Lubet P, 1973 Exposé synoptique des données biologiques sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1818). Synopsis FAO sur les pêches, n° 88, FAO, Rome, 43 p.

McDonald J H, Seed R & Koehn R K, 1991 Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and the Southern hemispheres. *Marine Biology* **111**. 323-333

Menioui M, 1988. Contribution à la connaissance des peuplements infralittoraux superficiels des côtes atlantiques et méditerranéennes du Maroc Thèse de Doctorat d'État,Université Mohammed V, Rabat (Maroc): 256 p.

Pasteur-Humbert C, 1962 Les mollusques marins testacés du Maroc II Les Lamellibranches et les Scaphopodes *Travaux de l'Institut Scientifique Chérifien* **28**· 184 p., 39 pl

Quesada H, Beynon C M & Skibinski D O F, 1995b A mitochondrial DNA discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk Pleistocene vicariance biogeography and secondary intergradation *Molecular Biology and Evolution* **12**(3): 521-524

Quesada H, Zapata C & Alvarez G, 1995a. A multilocus allozyme discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis*· the interaction of ecological and life history factors *Marine Ecology Progress Series* **116** 99 115

Sanjuan A, Zapata C & Alvarez G, 1994 *Mytilus galloprovincialis* on the coasts of the Iberian Peninsula *Marine Ecology Progress Series* **113**. 131-146

Sanjuan A, Comesana A.S & De Carlos A., 1996 Macrogeographic differentiation by mtDNA restriction site analysis in the S W European *Mytilus galloprovincialis* Lmk *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **198**. 89-100.

Seed R 1968 Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis* *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **48**· 561-584.

Seed R 1971 A physiological and biochemical approach to the taxonomy of *Mytilus edulis* L. and *M galloprovincialis* Lmk. from S.W. England. *Cahiers de Biologie Marine* **12**: 291-322.

Seed R 1972 Morphological variation in *Mytilus* from the French coasts in relation to the occurrence and distribution of *Mytilus galloprovincialis*. *Cahiers de Biologie Marine* **13**: 357-384.

Seed R 1978 The systematics and evolution of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) In: Marine organisms genetics, ecology and evolution (B Battaglia & J A Beardmore eds)· 447 468 Plenum Press, New York

Seed R., 1992 Systematics, evolution and distribution of mussels belonging to the genus *Mytilus* an overview. *American Malacological Bulletin* **9**: 123-137

Shafee M S, 1989. Reproduction of *Perna picta* (Mollusca. Bivalvia) from the Atlantic coast of Morocco *Marine Ecology Progress Series* **53**. 235-245

Shafee M S, 1992 Production estimate of a mussel population *Perna picta* (Born) on the Atlantic coast of Morocco. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **163**: 183-197.

Skibinski D O F.& Edwards C A, 1987 Studies of mitochondrial DNA variation in marine mussels (*Mytilus*). Proceedings of the World Symposium on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture of Fish and Shellfish, Bordeaux (France) 1986, 1: 209-226.

Skibinski D O F, Ahmad M & Beardmore J.A, 1978 Genetic evidence for naturally occuring hybrids between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovencalis*. *Evolution* **32**: 354-364.

Skibinski D.O F., Cross T F & Ahmad M, 1980 Electrophoretic investigation of systematic relationships in the marine mussels *Modiolus modiolus*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovencalis* in the British Isles *Biological Journal of the Linnean Society* **13**: 65-73

Skibinski D O F, Beardmore J A. & Cross T.F, 1983 Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae; Mollusca) in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society* **19**: 137 183

Soot-Ryen T, 1955. A report on the family *Mytilidae* (*Pelecypoda*). *Allan Hancock Pacific Expedition, Reports*, **20**. 174 p

Vainolá R & Hvilsom M M, 1991. Genetic divergence and a hybrid zone between Baltic and North Sea *Mytilus* populations (Mytilidae· Mollusca) *Biological Journal of the Linnean Society* **43**. 127 148

Varvio S-L., Koehn R K. & Vainola R, 1988 Evolutionary genetics of the *Mytalus edulis* complex in the Northern Atlantic region. *Marine Biology* **98**. 51-60.

Zine N E & Menioui M, 1992 Le peuplement malacologique de la lagune méditerranéenne de Nador (Maroc): état des connaissances *Vie Marine/Marine Life* **2**(1): 39-45.

Zaouali J., 1973. Note sur la présence de *Perna perna* L. (= *Mytilus africanus* Chemn.) dans la région de Bizerte. *Bulletin de l'Institut Océanographique de Salambo* **2**. 637-642.

Histopathological damages caused by the copepod *Mytilicola orientalis* in the oyster *Crassostrea gigas* from the Bay of Brest (Brittany, France)

Gaël LE PENNEC [1] and Marcel LE PENNEC [2]

ABSTRACT

Oyster (*Crassostrea gigas*) culture is of great economical interest in France which is the largest producer in Europe, with 150000 t/year. Numerous culture sites are scattered along the littoral, including the bay of Brest. One of the major risks associated with this activity is the presence of harmful parasites, like certain copepod species. A 10 years survey carried out in Brittany by IFREMER Center of La Trinité Sur Mer revealed that the copepod, *Mytilicola orientalis*, was present in all the sites studied. The purpose of this study was to improve the knowledge of the relationship between this copepod and its host, *Crassostrea gigas*. Histopathologic analysis reveal some damages to the host's digestive epithelium, which is associated with a metaplasia involving the replacement of normal ciliated columnar cells by non-ciliated cuboidal cells. There is also a loss of cells produced by the movements of the copepod appendages, an alteration of the basal membrane and a change in the underlying connective tissue which presents an hemocyte infiltration and becomes more lacunous. The consequences of this association on the oyster culture is discussed.

RÉSUMÉ

Dommages histopathologiques provoqués par le copépode *Mytilicola orientalis* chez l'huître *Crassostrea gigas* de la rade de Brest (Bretagne, France)

L'élevage de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est d'une importance majeure en France dans l'économie des produits de la mer puisque ce pays est le premier producteur en Europe avec 150000 t/an. De nombreux sites d'élevage sont distribués le long du littoral, rade de Brest incluse. Une des menaces qui pèse sur cette filière est la présence, dans les eaux marines, d'organismes pathogènes dont certains copépodes. Parmi ceux ci *Mytilicola orientalis*, présent sur tout le littoral français, est l'objet d'une surveillance attentive, sur les côtes bretonnes, de la part du Centre IFREMER de la Trinité Sur Mer. Le but de notre étude est de mieux appréhender l'association entre l'huître et le copépode et de voir quelles en sont les conséquences. Des analyses histologiques révèlent les dommages provoqués par la présence du

[1] Institut fur Physiologische Chemie, Johannes Gutenberg-Mainz Universitat, Duesbergweg 6, D-55099- Mainz, Germany

[2] LEMAR, UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, F-29280-Plouzané, France

copépode dans le tractus digestif de l'hôte. Une modification de l'aspect de l'épithélium cellulaire peut se produire, des lésions, une altération de la membrane basale, des infiltrations hémocytaires et la formation de lacunes dans le tissu conjonctif sous-jacent. Les conséquences de cette association hétérospécifique sur l'aquaculture de l'huître creuse sont discutées.

INTRODUCTION

In 1977, for the first time in Europe, the copepod *Mytilicola orientalis* Mori, 1935 was found associated with *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1791) in the bay of Arcachon (France) (His, 1977; His *et al.*, 1978). According to His (1977), oysters of any ages, from the spat to the adult can harbor this species of copepod, and its number ranged from 4 to 5 and sometimes up to 34 within the same host. It is considered that the oyster spat imported from Japan and also genitors from British Columbia (Canada), introduced in the bay of Arcachon in the years seventies, caused the introduction of *M. orientalis* on the French littoral. By this way this crustacean was introduced from Japan to the Pacific coasts of North America in Puget Sound, Washington, USA (Wilson, 1938) and British Colombia, Canada (Bernard, 1969).

In France, *C. gigas* is of great importance in the economy of marine products as 150000 t are commercialized per year, placing this country at the first place in Europe for this species. This oyster farming is not secure from threats of pathogens, as it has been illustrated by the disease of *Crassostrea angulata*, which totally disappeared of the french coasts due to an iridovirose (Le Deuff, 1995) and *Ostrea edulis* which has almost disappeared in Brittany (production of 20000 t/y in the seventies, 2000 t/y in 2000). Heavy mortalities of the flat oyster were attributed in first instance to the protists *Marteilia refringens* and later to *Bonamia ostreae* (Grizel, 1985).

The presence of *M. orientalis*, considered as a bivalve parasite (Odlaug, 1946; Sparks, 1962), in the oyster populations of the French coasts is one of source of restlessness which has motivate a monitoring of some banks of the North and South coasts of Brittany as a part of tasks of the IFREMER Center of La Trinité sur Mer (J. Mazurié, IFREMER, pers. com.).

The aim of this study is to establish how this copepod can injure its host by its presence in the digestive tract.

MATERIALS AND METHODS

Fifty individuals of *C. gigas* were collected in early July 1998, in the bay of Brest, close to a culture site, to discover the location of the parasite in the host organs and to see the possibility of histopathological effects on the digestive tract of infested oysters. The visceral masses of 5 of them were fixed in Bouin immediately after gathering. Samples were then dehydrated in graduated alcohol and embedded in paraffin wax. Sections of 5 µm were made with a microtome and stained with Masson trichrome before observations under a light microscope.

Some copepods expelled from the oysters during dissection of the visceral mass were prepared for scanning electron microscopy observations. They were critical point dried, mounted on copper tape, coated with gold under vacuum and examined under a JEOL, JSM 35, electron microscope.

RESULTS

40% of the 50 specimens of oyster examined were infested by the copepod. Their number ranged from 1 (generally a female), to 3 or 4 (juveniles or males) in the anterior portion of the digestive tract.

Males of *M. orientalis* are small, around 4 mm in total length, against 10 to 12 mm for the females. In both sexes the body is narrow and elongated (Figures 1, 2). Metamerisation is affected by the total fusion of the five thoracic segments and the genital segment. Each of the thoracic segments is enlarged at posterior corners, but without processes (Figure 1).The appendages and notably the antennae, are well developed (Figures 3, 4). Abdomen is narrow and ends by a cylindrical caudal rami (Figure 5). Ovisacs are elongated and cylindrical (Figure 6).

Egg-carrying females move between the labial palps, the anterior part of the body into the lumen of the esophagus and the abdomen outside, to expulse the nauplii (Figure 6) in the pallial cavity of the host.

On histological slides copepods were observed in the lumen of the esophagus or stomach of the oysters (Figure 7), sometimes up to three individuals on the same stomach cross section, filling almost entirely the lumen (Figure 8).

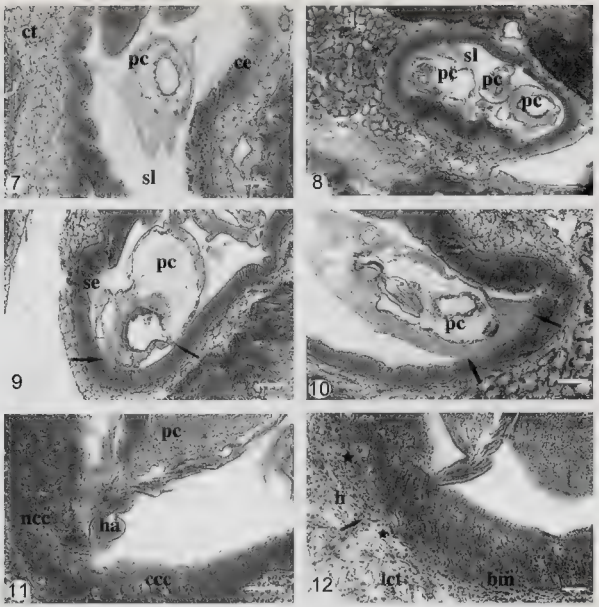
The observations of histopathology show an injury of the host cell lining the lumen of the gut (Figures 9 12). The damages are often associated with a metaplasia which consists in a modification of the shape of epithelial cells which turn from ciliated columnar to non-ciliated cuboidal cells (Figures 11, 12). There is also a loss of cells produced by the movements of the appendages, a slight hemocytic accumulation, an alteration of the basal membrane, and finally beneath the areas of epithelial metaplasia, there appears like a fibrosis of the underlying connective tissue which becomes more lacunous (Figures 11, 12).

DISCUSSION

M. orientalis is the dominant mytilicolid invading bivalves in the Pacific. Since its description by Mori (1935) from the gut of *C. gigas* and *Mytilus crassitesta* in the Inland Sea of Japan, the parasitic copepod has been found associated with numerous bivalve species, from Pacific to Atlantic, such as: *Ostrea lurida*, *Mytilus edulis*, *Protothaca staminea* (see Odlaug, 1946), *Mytilus californianus* and *Saxidomus giganteus* (see Chew *et al.*, 1967), *Mytilus galloprovincialis* (see Le Dantec and Borel, 1964), *Clinocardium nuttalli* (see Bernard, 1969) and also with the gastropod *Crepidula fornicata* (see Odlaug, 1946).

Results of a 10 year survey of oyster farming sites of Brittany, carried out by IFREMER Center of La Trinité Sur Mer, from January 1990 to December 2000, revealed that the copepod was present in 70% of the oyster samplings (5360 individuals examined) from any coastal site of Brittany, with a dominance up to 85% in the North (A.G. Martin, IFREMER La Trinité Sur Mer, pers. com.). It seems that the seawater temperature, lower in the North than in the South of Brittany is the factor explaining this situation as it has been demonstrated with the mussel parasitic copepod *Modiolicola gracilis* in South California (Mexico) (Caceres Martinez *et al.*, 1996). Results of IFREMER also showed that, from 1990 to 2000, the level of prevalence can fluctuate rapidly from one year to another but is always staying under 30%, lower than the 44% recorded in 1977 in the bay of Arcachon (His *et al.*, 1978). We must precise that the IFREMER program consists of a general survey of microscopical parasites, based on histology. The objective is not a specific study of the parasitic copepod, but an examination of tendancies of parasitical actions against oysters, during a long period and on a large area

Figures 1-6 *Mytilicola orientalis*. 1 Male adult, dorsal view. Body long and worm-like Head (h) separated from thorax (t) Each thoracic segment with a pair of prominent posterolateral protuberances (p) Abdominal segmentation (a) incomplete Caudal rami (f), cylindrical and slightly divergent Scale bar 0 5 mm 2. Male adult, ventral view Some thoracic swimming legs (p1, p2) are visible Scale bar. 0 5 mm. 3 Cephalic region, ventral view. First antenna (A1) of four segments with bristles, second antenna (A2) hook shaped Upper lip (l) subtriangular, mandible (Md) short and first maxilla (Mx) Th1, first thoracic segment Scale bar 0.2 mm. 4 Detail of perbuccal region Second antenna (A2) with terminal segment in the form of a chitinized hook (h) curving towards midline of body 1, upper lip Mandible (Md) with sharp bristles, first maxilla (Mx) in form of triangular plate Scale bar 0 2 mm. 5 Genital segment (gs) of a female Ovisac sectioned showing the eggs inside F, furca Scale bar 200 µm 6 Nauplu (n) ready to be expelled from the egg sac (eg). Scale bar: 200 µm.



Figures 7-12 Histological views of *Mytilicola orientalis* in the gut of *Crassostrea gigas* 7 Cross section (5 µm) of one copepod (pc) in the stomach lumen of the oyster Probably, the copepod recently reached the digestive gut as the columnar and wavy epithelium (ce) is not altered Ct, underlying connective tissue (scale bar. 20 µm). 8. Obstruction of the stomach lumen by three specimens of the copepods (pc). Se, stomach epithelium, dg, digestive gland (scale bar 20 µm) 9-10 Mechanical effects (arrows) of the copepod (pc) on the gut epithelium (se) The ciliature disappears and the epithelium losts its wavy aspect (scale bar: 20 µm). 11-12. Evidence of damage to the host tissues caused by the hook of the antenna (ha) The ciliated columnar cells (ccc) turn in non ciliated cuboidal cells (ncc) and some cells are teared The basal membrane disappears (asterisk) and a slight hemocytic accumulation (h) appears (arrow). The connective tissue (lct) becomes more lacunous (scale bar 10 µm)

In Europe, another parasitic copepod, *Mytilicola intestinalis* Steuer, 1902, has been implicated as a major pathogen in mussels (Korringa, 1968. Li and Clyburne, 1979; Mumford *et al.*, 1981; Davey and Gee, 1988) It interfers with the bivalve feeding by destruction of host mucosa lining in *Mytilus edulis* (Couteaux-Bargeton, 1953) and causing obstruction of the intestine in *Mytilus galloprovincialis* when their numbers become high (Figueras *et al.*, 1991; Robledo *et al.*, 1994)

In the contrary to *M. intestinalis* which has been blamed for mass mortalities of mytilids, and even the numerous investigations conducted by various authors are equivocal (see references in Lauckner, 1983), *M. orientalis* is considered as having a low degree of pathogenicity. However, it is obvious that this copepod causes some anatomical and physiological disorders in its hosts

Odlaug (1946) was the first to notice that *M. orientalis* could be responsible for the loose of meat weight in *O. lurida* Several years later Katkansky *et al.* (1967) and then His (1977), demonstrated that increasing of infestation rate by this parasite was the cause of the decrease of the condition index in *C. gigas* The reduction in the condition index in heavily infected bivalves by parasitic copepods seems to be a general rule (Caceres-Martinez *et al.*, 1996)

Some authors have shown that *M. orientalis* produced modifications in the epithelial tissue of the host digestive tract (Sparks, 1962; His, 1978). Our observations confirmed that the change in position of the parasite inside the digestive tract produce damages in various areas Moreover, the hooks of the antennae cause erosion of the duct epithelia. We have noticed the replacement of the ciliated columnar cells by non ciliated cuboidal cells, the disappearance of the basal membrane and the modification of the connective tissue which is destabilized under the region attacked. Most of these damages have also been recorded in the intestinal epithelium of *C. gigas* caused by the parasitic copepod *M. intestinalis* (Sparks, 1962).

Other damage induced in *C. gigas* by the parasite *M. orientalis* , when their numbers increase within the same host, is the obstruction of the digestive duct. Circulation of products during the digestive process is difficult to pass through sites where parasites are concentrated and moreover, a part of these products is derived to the benefit of the parasites (Lauckner, 1983). Another part of these nutritional substances could also derive from the host's tissue. Studies of nutritional requirements of endoparasites have indicated that depletion of a host's nutrients by parasites may have serious consequences, especially when the parasite density is sufficiently great (Lauckner, 1983). In August 1977, 34 °o of *C. gigas* dyed in the bay of Arcachon and, according to His (1978), *M. orientalis* could have been the major responsibility in these mortalities due to the great number of the parasite, up to 34/oyster. Rankin (1943, cited by Sparks, 1962), considered than oyster mortalities could be produced when *C. gigas* was infested by 12 *M. orientalis* or more.

During the last decade, mortalities of *C. gigas* were observed in France on various parts of the littoral and several hypothesis were formulated to try to explain them. One was based on infestation by a Herpes-like virus, as it was observed in the oyster larvae reared in hatchery, in New Zealand (Hine *et al.*, 1992) and France (Nicolas *et al.*, 1992). Mass mortalities of spat, 3 to 7 months aged, were also observed in association with a virus belonging to the Herpesviridae (Renault *et al.*, 1994) Other was that physiological perturbation following the gamete emissions involving a weakening of the individuals and their death (Goulletquer *et al.*, 1998). These recurrent mortalities, which appear mainly in summer, have a strong incidence on the oyster farming as in some place around 50% of the stock have disappeared in 2000 (P. Goulletquer,

IFREMER, La Tremblade, pers. com.). Facing this problem a large research program, named "MOREST" (summer mortalities), was initiated by IFREMER in 2001. Biology, ecology and physiology of *C. gigas* will be taken into account and also the role of pathogen organisms. The exact pathological effect attributable to the parasitic copepod *M. orientalis* remains uncertain and the 10 years survey of infested oysters conducted in Brittany allow to point out that host population is capable of sustaining the infestation. Nevertheless, it is not impossible that the infestation by *M. orientalis*, acting in synergy with other exogenous mechanisms, such as temperature (Soletchnik *et al.*, 1999), salinity (Calvo *et al.*, 1999), hypoxy and toxic blooms (Mazouni *et al.*, 1996), or endogenous, such as a deficiency in metabolites (Tremblay *et al.*, 1998) could be one of the factors leading to mortalities in *C. gigas*. The multifactorial aspect of a bivalve mortality was clearly demonstrated in *C. virginica* infested by the parasitic protozoa *Perkinsus marinus* (Bower *et al.*, 1994). Moreover, some authors such as Davey (1989) and Bower *et al.*(1994) considered that these copepods could be a kind of vector for various virulent pathogens as protozoa, fungi, bacteria and virus.

REFERENCES

Bernard F.R., 1969. The parasitic copepod *Mytilicola orientalis* in British Columbia bivalves. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* **2**: 190-191.

Bower S.M., Hervio J.M. & McGladery S.E., 1994. Potential for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, to serve as a reservoir host and carrier of oyster pathogens. *International Council for the Exploration of the Sea*, Meeting Paper, **5**: 10-14.

Caceres-Martinez J., Vasquez-Yeomans R. & Suarez-Morales E., 1996. Two parasitic copepods, *Pseudomyicola spinosus* and *Modiolicola gracilis*, associated with edible mussels, *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*, from Baja California, NW Mexico. *Journal of Shellfish Research* **15**(3): 667-672.

Calvo G.W., Luckenbach M.W., Allen S.K. Jr & Burreson E.M., 1999. Comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973) and *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research* **18**: 465-473.

Cheng T.G., 1967. Parasites of commercially important marine mollusks. The class Crustacea. *In* "Advances in Marine Biology" (Russell F., ed.), vol. 5: 286-344. Academic Press, London and New York.

Chew K.K., Sparks A.K. & Katkansky S.C., 1964. First record of *Mytilus orientalis* Mori in the California mussel *Mytilus californianus* Conrad. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* **21**: 205- 207.

Couteaux-Bargeton, M., 1953. Contribution à l'étude de *Mytilus edulis* L., parasite par *Mytilicola intestinalis* Steuer. *Conseil International pour l'Exploration de la Mer* **19**: 80-84.

Davey J.T.,1989. *Mytilicola intestinalis* (Copepoda: Cyclopoida): A ten year survey of infested mussels in a Cornish estuary, 1979-1988. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* **69**: 823-826.

Figueras A.J., Jardon C.F. & Caldas J.R., 1991. Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): Preliminary results. *Aquaculture* **99**: 17-33.

Goulletquer P., Soletchnik P., Le Moine O., Razet D., Geairon P., Faury N. & Taillade S., 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the bay of Marennes-Oléron (France). *International Council for the Exploration of the Sea*, CM-1998/CC: 14.

Grizel H., 1985. Etudes des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* (Linné) et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse de Doctorat d'État, Université de Montpellier, 145 p.

Hine P.M., Wesney B. & Hay B.E., 1992. Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* **12**(2): 135-142.

His E., 1977. Observations préliminaires sur la présence de *Mytilicola orientalis* Mori (1935) chez *Crassostrea gigas* Thunberg dans le bassin d'Arcachon. *Bulletin de la Société Géologique et Amis du Muséum du Havre* **64**(2): 7-8.

His E., Tige G. & Raboun M.A., 1978. *Mytilicola orientalis* Mori: son action sur les huîtres du bassin d'Arcachon au cours de l'été et de l'automne 1977. Conseil International pour l'Exploitation de la Mer. CM 1978/K:14.

Katkansky S.C., Sparks A.K. & Chew K.K.,1967. Distribution and effects of the endoparasitic copepod, *Mytilicola orientalis*, on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, on the Pacific coast. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* **57**: 50-58.

Korringa P., 1968. On the ecology and distribution of the parasitic copepod *Mytilicola intestinalis* Steuer. *Bijdrage tot de Dierkunde* **38**: 47-52.

Lauckner G., 1983. Diseases of Mollusca: Bivalvia. *In* "Diseases of Marine Animals. Introduction, Bivalvia to Scaphopoda" (Kinne O., ed.). Vol. II: 817-846. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg.

Le Dantec J. & Borel M., 1964. Les moules du littoral atlantique au sud de la Gironde et leurs crustacés parasites (observations d'octobre 1963 à avril 1964) sur la rive gauche de la Gironde et dans le bassin d'Arcachon. Conseil International pour l'exploration de la mer. Commission Mollusques et Crustacés n° 49.

Le Deuff R.M., 1995. Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux Iridoviridae et aux Herpesviridae. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux II. 234 p.

Li M.F. & Clyburne S.N., 1979. Mortalities of blue mussel (*Mytilus edulis*) in Prince Edward Island. *Journal of Invertebrate Pathology* **33**: 108-110.

Mazouni N., Gaertner J.C., Deslous-Paoli J.M., Landrein S. & Geringer d'Oedenberg M., 1996. Nutrient and oxygen exchanges at the water-sediment interface in a shellfish farming lagoon (Thau, France). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **205**: 91-113.

Moore M.N., Lowe D.M. & Gee J.M., 1978. Histopathological effects induced in *Mytilus edulis* by *Mytilus intestinalis* and the histochemistry of the copepod intestinal cells. *Journal du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* **38**: 6-11.

Mori T., 1935. *Mytilicola orientalis*, a new species of parasitic Copepoda. *Zoological Magazine* **47**: 687-690.

Munford J.G., Daros L. & Strada, R., 1981. A study of the mass mortality of mussels in the Laguna Veneta. *Journal of World Mariculture Society* **12**(2): 186-199.

Nicolas J.L., Comps M. & Cochennec N., 1992. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathology* **12**(1): 11-13.

Odlaug T.O., 1946. The effect of the copepod, *Mytilicola orientalis*, upon the Olympia oyster, *Ostrea lurida*. *Transactions of the American Microscopical Society* **65**: 311-317.

Renault T., Cochennec N., Le Deuff M. & Chollet B., 1994. Herpes-like virus infecting japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bulletin of the European Association of Fish Pathology* **14**(2): 64-66.

Robledo J.A.F., Santarem M.M. & Figueras A., 1994. Parasite loads of rafted blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Spain with special reference to the copepod, *Mytilicola intestinalis*. *Aquaculture* **127**: 287-302.

Sparks, A.K., 1962. Metaplasia of the gut of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) caused by infection with the copepod *Mytilicola orientalis* Mori. *Journal of Invertebrate Pathology* **4**: 57-62.

Soletchnik P., Le Moine O., Faury N., Razet D., Geairon P. & Goulletquer P., 1999. Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron. Etude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'information géographique (SIG). *Aquatic Living Ressources* **12**: 131-143.

Tremblay R., Myrand B., Sevigny J.M., Blier P. & Guderley H., 1998. Bioenergetic and genetic parameters in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.) to summer mortality. *Journal of Experimental Biology and Ecology* **221**: 27-58.

Wilson C.B., 1938. A new copepod from Japanese oysters transplanted to the Pacific coast of the United States. *Journal of the Washington Academy of Sciences* **28**: 284-288.

BIBL DU MUSEUM PARIS

Normes diverses

Les noms de taxa devront être cités et utilisés conformément au Code International de Nomenclature Zoologique (édition de 2000). Les noms génériques ou spécifiques seront écrits en *italique*, les noms de familles ou de divisions d'un rang plus élevé, en caractères normaux. Un nom spécifique, générique ou familial apparaissant pour le première fois dans le texte devra être accompagné de son auteur et date de publication. Auteur et date d'un taxon seront toutefois omis dans le titre de l'article. On évitera les tournures de phrases donnant lieu à confusion entre une référence bibliographique et l'auteur et date d'un taxon.

La bibliographie comprendra toutes les références citées dans le texte, et uniquement celles-ci. Toutefois, les références citées uniquement en tant qu'auteur et date d'un taxon ne sont pas obligatoirement incluses dans la bibliographie. Les titres des périodiques doivent apparaître *in extenso*. Les références seront citées selon un des modèles suivants:

Bourguignat J.R., 1857. Aménités malacologiques. *Revue et Magasin de Zoologie* (2)9: 3-31, pl. 1-4.

Swofford D.L. & Olsen G.J., 1990. Phylogeny reconstruction. *In:* Molecular systematics. (D.M. Hillis & C. Morris, eds.): 411-501. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets.

Dans le texte, on citera les références sous la forme "... selon Hall (1986)... ", "(Hall et Smith, 1986)", (Richardson *et al.*, 1985)...". Pour plusieurs articles d'un même auteur et d'une même date, on utilisera la forme "1985a, 1985b..."

Les tirés-à-part devront être commandés au moment des épreuves. Pour chaque article, 25 tirés-à-part gratuits seront envoyés aux auteurs. Des tirés-à-part supplémentaires, payants, pourront être commandés au même moment.

Comité de rédaction

Patrick ARNAUD	Station Marine d'Endoume, Rue de la Batterie des Lions, F-13007 Marseille
Alan BEBBINGTON	3 Crawley Lane, Uley, Nr Dursley, Glos GL11 5 BJ, Grande-Bretagne
Alain BODOY	IFREMER, Rue de l'Ile d'Yeu,B.P. 1049 - F-44037 Nantes cedex 01
Pio FIORONI	Universität Münster, Institut für Spezielle Zoologie und Vergleichende Embryologie, Hüfferstraße 1, D-48149 Münster, Allemagne
Serge GOFAS	Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias Universidad de Málaga, E-29071 Málaga, Espagne
Marcel LE PENNEC	Institut Universitaire Européen de la Mer, F-29280 Plouzané
Pierre LUBET	Laboratoire de Zoologie, I.B.B.A., Faculté des Sciences, 14032 Caen cedex
Mathieu POULICEK	Laboratoire d'Ecologie marine, Institut de Zoologie, Université de Liège, 22 Quai van Beneden, B - 4020 Liège, BELGIQUE
Jean TARDY	51, rue Emile Racaud, F-17000 La Rochelle
Nardo VICENTE	C.E.R.A.M., Faculté des Sciences et Techniques, de Saint Jérôme, F-13397 Marseille cedex 13

Directeur de la publication: Nardo VICENTE, Président de la S.F.M.
Coordonnateur de ce volume: Serge GOFAS

Société Française de Malacologie - siège : 55, rue Buffon, F-75005 Paris ISSN: 0397.765 X
Imprimé en Espagne par Imagraf, Málaga - Achevé d'imprimer le 30 mars 2003

Sommaire

Articles issus du XI[ème] congrès "Malacologie 2000" de la Société Française de Malacologie (Caen, 2001)

S. BENOMAR, K. KELLNER, A. OUICHOU, M. MATHIEU & A. MOUKRIM
Contribution à l'étude des cellules neurosécrétrices de la moule africaine *Perna perna*: Etudes histologique et immunocytochimique 1

J.-M. PONCET, A. SERPENTINI, E. BOUCAUD-CAMOU & J.-M. LEBEL
Utilisation de cultures primaires de cellules de manteau d'ormeau (*Haliotis tuberculata*) pour l'étude de la synthèse *in vitro* de la matrice extracellulaire et de la biominéralisation 21

K. KELLNER, C. HEUDE-BERTHELIN & M. MATHIEU
Transport du glucose dans les cellules vésiculeuses d'huître creuse *Crassostrea gigas* 31

M. VIANEY-LIAUD
Appariement et reproduction chez un hermaphrodite simultané, la planorbe *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastéropode, Pulmoné) 41

M. VIANEY-LIAUD
Effets molluscicides de saponines extraites des graines de tomate 45

Articles remis régulièrement

F. EL HAMIDI, A. BANAOUI, M. AZDI , A. KAAYA, A. ZEKHNINI & A. MOUKRIM
Utilisation de la réponse de quatre biomarqueurs d'exposition chez les bivalves *Perna perna* et *Donax trunculus* pour l'évaluation de la pollution dans la baie d'Agadir (Sud du Maroc) 51

H. JAZIRI & L. SBABOU
Variabilité morphologique et systématique de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Bivalvia, Mytilidae) au Maroc 61

G. LE PENNEC & M. LE PENNEC
Histopathological damages caused by the copepod *Mytilicola orientalis* in the oyster *Crassostrea gigas* from the Bay of Brest (Brittany, France) 73